

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008年1月17日 (17.01.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/007755 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/00 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/063946

(22) 国際出願日: 2007年7月13日 (13.07.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2006-193053 2006年7月13日 (13.07.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木村 直紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 川合 重人 (KAWAI, Shigeto) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL DEATH INDUCER

(54) 発明の名称: 細胞死誘導剤

(57) Abstract: The object is to provide an antibody having a high cell death-inducing activity. To achieve the object, a mouse is immunized with a cell capable of expressing both human HLA class IA and human β 2 microglobulin (β 2M) to produce monoclonal antibodies. The monoclonal antibodies are screened for an antibody having a cell death-inducing activity, and 10 clones are obtained. The analysis of the clones reveals that three clones (C3B3, C11B9, C17D11 antibodies) which has an α 2 domain of HLA class I antigen in their epitopes can cross-link with an anti-murine IgG antibody to show a potent cytotoxic activity. When a diabody of the C3B3 antibody is produced, it is found that the diabody shows a more potent anti-tumor effect compared to that of a diabody of a 2D7 antibody which is a known antibody against HLA class IA.

(57) 要約: 本発明は高い細胞死誘導活性を有する抗体を提供することを課題とする。本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、ヒトHLA class I Aと、ヒト β 2マイクログロブリン (β 2M) を発現する細胞をマウスに免疫し、モノクローナル抗体を得た。得られた抗体のうち、細胞死誘導活性を有する抗体のスクリーニングを行い、10クローンを得た。これらのクローンの解析を行ったところ、HLA class I抗原の α 2ドメインをエピトープに持つ3クローン (C3B3、C11B9、C17D11抗体) は抗マウスIgG抗体でクロスリンクすることにより強い細胞傷害活性を示すことを見出した。さらにC3B3抗体のdiabodyを作製したところ、該diabodyは従来のHLA class I Aの抗体である2D7抗体のdiabodyに比べて、より強い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

WO 2008/007755 A1

明 細 書

細胞死誘導剤

技術分野

[0001] 本発明は、HLAを認識する抗体、および該抗体を有効成分として含有する細胞死誘導剤に関する。

背景技術

[0002] HLAは外来性の抗原、細菌、ウイルス感染細胞等を異物と認識し除去する免疫反応において重要な分子である。HLA分子の主な役割は、細胞の中で作られる8～10程度のアミノ酸でできた抗原ペプチドをCD8+T細胞に提示することであり、これによって誘導される免疫応答や免疫寛容に非常に重要な役割を担っている。HLAは、 α 1～3の3つのドメインからなる45KDの α 鎖と12KDの β 2マイクログロブリン(β 2M)のヘテロダイマーによって形成されるclassIと、 α 1、 α 2の2つのドメインからなる30～34KDの α 鎖と β 1、 β 2の2つのドメインからなる26～29KDの β 鎖のヘテロダイマーによって形成されるclassIIに分類される。さらに、HLA classI (HLA-I)には、HLA-A、B、C等の存在が知られている(以下において、HLA-Aを「HLA classI A (HLA-IA)」とも称する)。

[0003] これまでに、リンパ球細胞において抗HLA classI A抗体によるライゲーシオンで、細胞増殖抑制効果や細胞死誘導効果が報告されており、HLA分子のシグナル伝達分子としての可能性が示唆されている。例えばヒトHLA classI Aの α 1ドメインに対する抗体B9.12.1、 α 2ドメインに対する抗体W6/32、 α 3ドメインに対する抗体TP25.99、A 1.4は、活性化リンパ球に対して細胞増殖を抑制するとの報告がある(非特許文献1, 2)。また、 α 1ドメインに対する二種類の抗体MoAb90, YTH862は、活性化リンパ球に対してアポトーシスを誘導することが報告されている(非特許文献2, 3, 4)。この2つの抗体によって誘導されるアポトーシスはカスパーゼを介した反応であることが明らかにされており(非特許文献4)、このことからリンパ球細胞で発現するHLA classI Aは、アポトーシスの信号伝達にも関与していると推測されている。

さらに、ヒトHLA classI Aの α 3ドメインに対する抗体 5H7(非特許文献5)、マウスM

HC class Iの α 2ドメインに対する抗体RE2(非特許文献6)も、活性化リンパ球などに細胞死を誘導することが報告されている。

[0004] ヒト骨髄腫細胞を免疫して得られたモノクローナル抗体2D7(非特許文献9)も、HLA class I Aを認識する抗体であり、該2D7を低分子化(diabody化)することにより、ヒト骨髄腫細胞に対して短時間で激しい細胞死を誘導することが報告されている。2D7 diabodyは、各種ヒト骨髄腫細胞株、および、活性化リンパ球細胞に対して強い細胞死誘導活性を示し、マウスにヒト骨髄腫細胞を移植した多発性骨髄腫モデルマウスにおいても、有意な延命効果を示したことから、骨髄腫治療薬として開発が進められている(特許文献1、2、3、4、非特許文献7、8)。このような、HLA class I関与の細胞死誘導を利用した治療をさらに発展させれば、骨髄腫等に対する有効性の高い医薬品が開発されるものと期待される。

[0005] なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

特許文献1:WO2004/033499

特許文献2:WO2005/056603

特許文献3:WO2005/100560

特許文献4:PCT/JP2006/309890

非特許文献1:Fayen et al., Int. Immunol., 10: 1347-1358(1998)

非特許文献2:Genestier et al., Blood, 90: 3629-3639 (1997)

非特許文献3:Genestier et al., Blood, 90: 726-735 (1997)

非特許文献4:Genestier et al., J. Biol. Chem., 273: 5060-5066 (1998)

非特許文献5:Woodle et al., J. Immunol., 158: 2156-2164 (1997)

非特許文献6:Matsuoka et al., J. Exp. Med., 181: 2007-2015 (1995)

非特許文献7:Goto, et al., Blood, 84: 1922-30 (1994)

非特許文献8:Kimura, et al., Biochem Biophys Res Commun., 325: 1201-1209 (2004)

非特許文献9:岡達三 三共生命科学財団研究報告集 12: 46-56 (1998)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明はこのような状況に鑑みて為されたものであり、その目的は、配列番号：7、8、9に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域を含む抗体を提供する。また、本発明は、配列番号：10、11、12に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体を提供することを目的とする。詳しくは、HLA class I Aを認識し、従来よりもさらに高い細胞死誘導活性を有する抗体を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を行った。まず、ヒトHLA class I Aと、ヒト β 2Mを共発現する細胞をマウスに免疫してモノクローナル抗体を得た。さらに、得られた抗体をスクリーニングし、細胞死誘導活性を有する10クローンの新たなモノクローナル抗体を得た。これらのクローンの解析を行ったところ、HLA class I抗原の α 2ドメインをエピトープに持つ3クローン(C3B3、C11B9、C17D11抗体)は抗マウスIgG抗体でクロスリンクすることにより、強い細胞傷害活性を示すことを見出した。さらに、得られたC3B3抗体を低分子抗体(C3B3 diabody)へと改変することにより、抗体単独で従来の抗HLA class IA低分子抗体(2D7 diabody)の抗腫瘍作用を大きく上回る細胞死誘導アゴニスト抗体を創製することに成功した。

[0008] 本発明は、より具体的には以下の[1]～[25]を提供するものである。

[1] 配列番号：7、8、9に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域を含む抗体。

[2] 配列番号：10、11、12に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

[3] 配列番号：7、8、9に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域および配列番号：10、11、12に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

[4] 以下の(a)～(d)のいずれかに記載の重鎖可変領域を含む抗体。

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

(b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する重鎖可変領域であって

、(a)に記載の重鎖可変領域と機能的に同等な重鎖可変領域

(c) 配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

(d) 配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

[5] 以下の(e)～(h)のいずれかに記載の軽鎖可変領域を含む抗体。

(e) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

(f) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域であって、(

e)に記載の軽鎖可変領域と機能的に同等な軽鎖可変領域

(g) 配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

(h) 配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

[6] 以下の(a)～(d)のいずれかに記載の重鎖可変領域および(e)～(h)のいずれかに記載の軽鎖可変領域を含む抗体。

(a) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

(b) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する重鎖可変領域であって、

(a)に記載の重鎖可変領域と機能的に同等な重鎖可変領域

(c) 配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

(d) 配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

(e) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

(f) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域であって、(

e)に記載の軽鎖可変領域と機能的に同等な軽鎖可変領域

(g) 配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

(h) 配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

[7] 以下の(a)～(d)のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する抗体。

(a) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列

(b) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列

(c) 配列番号:5に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号:5に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列

[8] [1]～[7]のいずれかに記載の抗体が結合するヒト白血球抗原(HLA)タンパク質のエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

[9] モノクローナル抗体である[1]～[8]のいずれかに記載の抗体。

[10] ヒト白血球抗原(HLA)を認識する、[1]～[9]のいずれかに記載の抗体。

[11] HLAがHLA classIである、[10]に記載の抗体。

[12] HLA classIがHLA-Aである、[11]に記載の抗体。

[13] 低分子化抗体である、[1]～[12]のいずれかに記載の抗体。

[14] 低分子化抗体がdiabodyである[13]に記載の抗体。

[15] 以下の(a)または(b)に記載のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号:1、3、または5に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) (a)に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ[1]～[14]のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチド。

[16] [15]に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[17] [15]に記載のポリヌクレオチドまたは[16]に記載のベクターを保持する宿主細胞。

[18] 以下の工程を含む[1]～[14]のいずれかに記載の抗体を作製する方法。

(a) [15]に記載のポリヌクレオチドを作製する工程

(b) (a)に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを作製する工程

(c) (b)に記載のベクターを宿主細胞に導入する工程

(d) (c)に記載の宿主細胞を培養する工程

[19] [1]～[14]のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤。

[20] B細胞又はT細胞に対する細胞死誘導であることを特徴とする、[19]に記載の細胞死誘導剤。

[21] B細胞又はT細胞が、活性化B細胞又は活性化T細胞である、[20]に記載の細胞死誘導剤。

[22] [1]～[14]のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。

[23] [1]～[14]のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤。

[24] 腫瘍が血液腫瘍である[23]に記載の抗腫瘍剤。

[25] [1]～[14]のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、自己免疫疾患治療剤。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]HLA発現Ba/F3細胞株、およびARH77細胞のHLA classI Aの発現量をFACSにて確認した結果を示す図である。

[図2]HLA classI Aのドメイン($\alpha 1 \sim \alpha 3$ ドメイン)のうち、1ドメインをマウスMHC classI Aの対応するドメインに置き換えたヒト・マウスキメラHLA classI Aを発現する細胞株の模式図を示したものである。

[図3]HLA-A/ $\beta 2$ マイクログロブリン($\beta 2M$)共発現Ba/F3細胞をマウスに免疫して得られた抗体10クローンのエピトープ解析の結果を表に示した。各種ヒト・マウスキメラHLA classI A発現Ba/F3細胞(MHH, HMH, HHM)に対する結合活性をFACSで解析し、結合が認められたものを(+)で、結合が認められなかったものを(-)で表した。それぞれの染色パターンから各クローンのエピトープを決定した。

[図4]HLA-A/ $\beta 2$ マイクログロブリン($\beta 2M$)共発現Ba/F3細胞をマウスに免疫して得

られた抗体10クローンのARH77に対する細胞死誘導活性を、二次抗体存在下、非存在下で検討した結果を示す図である。

[図5-1]2D7、および新たに得られたC3B3、C17D11、C11B9の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す図である。

[図5-2]2D7、および新たに得られたC3B3、C17D11、C11B9の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す図である。

[図6]C3B3 minibodyのゲルろ過クロマトグラフィー精製による分離チャートを示した図である。

[図7]ゲルろ過クロマトグラフィーにより分離されたC3B3 minibodyのピーク(1)～(3)それぞれの、ARH77に対するin vitro細胞傷害活性を示したグラフである。

[図8]C3B3 diabody (C3B3 DB)、および2D7 diabody (2D7 DB) それぞれの、ARH77に対するin vitro 細胞増殖抑制活性を示したグラフである。

[図9]C3B3 diabody (C3B3 DB)、および2D7 diabody (2D7 DB) それぞれの、ヒト由来骨髓腫細胞 (ARH77、IM-9、HS-Sultan、MC/CAR) に対するin vitro 細胞増殖抑制活性を示したグラフである。

[図10]IM-9移植マウスにおいて、PBS/tween20(コントロール)、2D7 diabody (2D7 DB)、あるいはC3B3 diabody(C3B3 DB)を投与したマウスの生存期間を示すグラフである。

[図11]IM-9移植マウスにおいて、PBS/tween20(コントロール)、2D7 diabody (2D7 DB)、あるいはC3B3 diabody(C3B3 DB)を投与したマウスの移植後14日目の血清中ヒトIgG量を示すグラフである。

[図12]C3B3 diabody、および2D7 diabodyそれぞれの、ヒト末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell、PBMC)に対するin vitro 細胞傷害活性を示したグラフである。

[図13]C3B3 diabody、および2D7 diabodyのヒトT細胞系腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を示した図面である。3日間培養におけるJurkat細胞に対する各抗体の増殖抑制効果を示す。

[0010] [発明の実施の形態]

本発明は、配列番号:7、8、9に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域を含む抗体に関する。また、本発明は、配列番号:10、11、12に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体に関する。

- [0011] 本発明者らは、HLA class Iを抗原とし、細胞死誘導活性を有する新たな抗体を得た。これらのうち、HLA class Iの α 2ドメインをエピトープに持つ3クローン(C3B3、C11B9、C17D11抗体)は抗マウスIgG抗体でクロスリンクすることにより、強い細胞傷害活性を示すことを見出した。さらに抗体エンジニアリング技術によりC3B3抗体を低分子抗体(diabody)へと改変することにより、抗体単独で従来の2D7抗体のdiabodyに比べて強い抗腫瘍効果を発揮するアゴニスト抗体(C3B3 diabody)を提供することに成功した。本発明はこれらの知見に基づくものである。
- [0012] 本発明は、配列番号:7、8、9に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域を含む抗体を提供する。また、本発明は、配列番号:10、11、12に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。
- [0013] 本発明の抗体は、上記配列番号:7、8、9に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域または配列番号:10、11、12に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を有するものであれば、特に限定されない。
- [0014] 本発明の抗体の好ましい例として、以下の(a)～(d)のいずれかに記載の重鎖可変領域を含む抗体が挙げられる。
- (a) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
 - (b) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する重鎖可変領域であって、(a)に記載の重鎖可変領域と機能的に同等な重鎖可変領域
 - (c) 配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
 - (d) 配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
- [0015] または、本発明の抗体として、以下の(e)～(h)のいずれかに記載の軽鎖可変領域を含む抗体が例として挙げられる。

(e) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

(f) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域であって、(e)に記載の軽鎖可変領域と機能的に同等な軽鎖可変領域

(g) 配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

(h) 配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

[0016] さらに、このような重鎖可変領域および軽鎖可変領域を有する抗体の例としては、以下の(a)～(d)のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する抗体が例として挙げられる。

(a) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列

(b) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列

(c) 配列番号:5に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号:5に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列

[0017] 重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。さらに、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を会合させた場合に、抗原結合活性を有する限り、一部を欠損させてもよいし、他のポリペプチドを付加してもよい。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。

[0018] ここで「機能的に同等」とは、対象となる抗体が、配列番号:7、8、9に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域または配列番号:10、11、12に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を有する抗体と同等の活性(例えば、HLA-Aへの結合活性、細胞死誘導活性、など)を有することを意味する。

[0019] あるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための、当業者によく知られた方法としては、ポリペプチドに変異を導入する方法が知られている。例えば、

当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA(1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492、Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766)などを用いて、本発明の抗体に適宜変異を導入することにより、該抗体と機能的に同等な抗体を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、本発明の抗体のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、該抗体と機能的に同等な抗体もまた本発明の抗体に含まれる。

[0020] 変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内(例えば、3アミノ酸以内)であると考えられる。変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

[0021] 本発明の抗体には、本発明の抗体のアミノ酸配列に複数個のアミノ酸残基が付加された抗体も含まれる。また、これら抗体と他のペプチド又はタンパク質とが融合した融合タンパク質も含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明の抗体をコー

ドするポリヌクレオチドと他のペプチド又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の抗体との融合に付される他のペプチド又はポリペプチドとしては、例えば、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 α -tubulinの断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明の抗体との融合に付される他のポリペプチドとしては、例えば、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) 等が挙げられる。市販されているこれらペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと融合させ、これにより調製された融合ポリヌクレオチドを発現させることにより、融合ポリペプチドを調製することができる。

[0022] また本発明は、本願発明で開示された抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体もまた提供する。すなわち本発明は、本発明の抗体が認識するエピトープと同一のエピトープを認識する抗体と、その用途に関する。このような抗体は、例えば、以下の方法により得ることができる。

被験抗体が、ある抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合すること、即ちある抗体とエピトープを共有することは、両者の同じエピトープに対する競合によって確認することができる。本発明において、抗体間の競合は、FACSや交叉ブロッキングアッセイなどによって検出することができる。FACSにおいては、まず本発明のモノクローナル抗体をHLA-IAを細胞表面に発現させた細胞に結合させて蛍光シグナルが測定される。次に、候補の競合抗体を細胞と反応後に本発明の抗体を同じ細胞と反応させて、同様にFACSにより解析する。あるいは、本発明のモノクローナル抗体と被験競合抗体とを同時に同じ細胞に反応させることもできる。競合抗体を反応させたときに、本発明の抗体のFACSの解析パターンが変化すれば、競合抗体が本発明の抗体と同じエピトープを認識することが確認できる。

[0023] その他、例えば競合ELISAアッセイは、好ましい交叉ブロッキングアッセイである。具体的には、交叉ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートのウェル上にHLA-IAを発現した細胞が固定される。候補の競合抗体の存在下、または非存在下でプレインキュベートした後に、本発明のモノクローナル抗体が添加される。ウェル中のHLA-IA発現細胞に結合した本発明の抗体の量は、同じエピトープへの結合に対して競合する候補競合抗体(被験抗体)の結合能と逆相関している。すなわち同一エピトープに対する被験抗体の親和性が大きくなればなる程、本発明の抗体のHLA-IAタンパク質発現細胞を固定したウェルへの結合量は低下する。あるいは逆に、同一エピトープに対する被験抗体の親和性が大きくなればなる程、被験抗体のHLA-IAタンパク質発現細胞を固定したウェルへの結合量は増加する。

[0024] ウェルに結合した抗体量は、予め抗体を標識しておくことによって、容易に測定することができる。たとえば、ビオチン標識された抗体は、アビジンペルオキシダーゼコンジュゲートと適切な基質を使用することにより測定できる。ペルオキシダーゼなどの酵素標識を利用した交叉ブロッキングアッセイを、特に競合ELISAアッセイという。抗体は、検出あるいは測定が可能な他の標識物質で標識することができる。具体的には、放射標識あるいは蛍光標識などが公知である。

更に被験抗体が本発明の抗体と異なる種に由来する定常領域を有する場合には、ウェルに結合したいずれかの抗体を、いずれかの種に由来する定常領域を特異的に認識する標識抗体によって測定することもできる。あるいは同種由来の抗体であっても、クラスが相違する場合には、各クラスを特異的に識別する抗体によって、ウェルに結合した抗体を測定することができる。

[0025] 候補の競合抗体非存在下で実施されるコントロール試験において得られる結合活性と比較して、候補抗体が、少なくとも20%、好ましくは少なくとも20-50%、さらに好ましくは少なくとも50%、本発明のモノクローナル抗体の結合をブロックできるならば、該候補競合抗体は本発明の抗体と実質的に同じエピトープに結合するか、又は同じエピトープへの結合に対して競合する抗体である。

[0026] 本発明の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体としては、例えば、上記[8]または[9]に記載の抗体が挙げられる。

また、上記〔8〕又は〔9〕に記載の抗体には、上述の通り、一価抗体だけでなく、多価抗体も含まれる。本発明の多価抗体には、全て同じ抗原結合部位を有する多価抗体、または、一部もしくは全て異なる抗原結合部位を有する多価抗体が含まれる。

[0027] 本発明の抗体は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られた抗体が、本発明の抗体と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の抗体を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の抗体のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明の抗体はこのような抗体も包含する。

[0028] 本発明の抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)、放射性物質、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている(例えば、US5057313、US5156840)。本発明における「抗体」にはこれらのコンジュゲート抗体も包含される。

[0029] 本発明の抗体としては、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ラクダ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。さらに本発明の抗体として、低分子化抗体等を用いることができる。

[0030] 本発明の抗体としては、抗体遺伝子を適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる(例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照)。具体的には、配列番号:7、8、9に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域または配列番号:10、11、12に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域コードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体の可変領域をコードするDNAを、抗体定常領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベク

ターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

[0031] また本発明は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードする限り、特に限定されず、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体である。本発明のポリヌクレオチドは天然以外の塩基を含んでいてもよい。本発明のポリヌクレオチドは、抗体を遺伝子工学的な手法により発現させる際に使用することができる。また本発明の抗体と同等な機能を有する抗体をスクリーニングする際に、プローブとして用いることもできる。即ち本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、またはその一部をプローブとして用い、ハイブリダイゼーション、遺伝子増幅技術(例えばPCR)等の技術により、該ポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするDNAを得ることができる。このようなDNAも本発明のポリヌクレオチドに含まれる。ハイブリダイゼーション技術(Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)は当業者によく知られた技術である。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジントな条件が挙げられる。低ストリンジントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジントな条件が挙げられる。高ストリンジントな条件とは、例えば65℃、5×SSC及び0.1%SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するポリヌクレオチドが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0032] これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により得られるポリヌクレオチドがコードする、本発明の抗体と機能的に同等な抗体は、通常、これら抗体とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明の抗体には、本発明の抗体と機能的に

同等であり、かつ該抗体のアミノ酸配列と高い相同性を有する抗体も含まれる。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。ポリペプチドの相同性を決定するには、文献(Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730)に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

[0033] 本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドの好ましい例としては、以下の(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドが挙げられる。

(a) 配列番号: 1、3、または5に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) (a)に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチド。

[0034] 抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。

本発明は上記ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明の抗体を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター(Wardら, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーター(Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043)、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1(ファルマシア社製)、「QIAexpress system」(キアゲン社製)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

[0035] また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよ

い。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

[0036] 大腸菌以外にも、例えば、本発明のポリペプチドを製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター(例えば、pcDNA3(インビトロゲン社製)や、pEGF-BOS(Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(ギブコBRL社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター(例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター(例えば、pPL608、pKTH50)が挙げられる。

[0037] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター(Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター(Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子(例えば、薬剤(ネオマイシン、G418など)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

[0038] さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター(例えば、pCHOIなど)を導入し、メトトレキセート(MTX)により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター(pcDなど)で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス(BPV)等の由

来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

[0039] 一方、動物の生体内で本発明のポリヌクレオチドを発現させる方法としては、本発明のポリヌクレオチドを適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウィルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウィルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウィルスベクター（例えばpAdexlcw）やレトロウィルスベクター（例えばpZIPneo）などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のポリヌクレオチドの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning, 5.61-5.63)。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

[0040] また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明の抗体の製造や発現のための産生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

[0041] 真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、NIH3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP (ベーリンガー

マンハイム社製)を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

[0042] 植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞がポリペプチド生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

[0043] 原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

[0044] これらの細胞を目的とするポリヌクレオチドにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、I MDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6~8であるのが好ましい。培養は、通常、約30~40°Cで約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

[0045] 一方、*in vivo* でポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするポリヌクレオチドを導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

[0046] 動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とするポリヌクレオチドを、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むポリヌクレオチド断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ

移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的の抗体を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるポリペプチドを含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

[0047] また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のポリヌクレオチドを挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のポリペプチドを得ることができる(Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

[0048] さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的のポリヌクレオチドを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム(*Nicotiana tabacum*)に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる(Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

[0049] これにより得られた本発明の抗体は、宿主細胞内または細胞外(培地など)から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる。

[0050] クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラム

が挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された抗体も包含する。

[0051] 本発明において、調製された抗体の抗原結合活性(Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)の測定には公知の手段を使用することができる。例えば、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

[0052] 本発明は、上記ポリヌクレオチドを作製する工程、該のポリヌクレオチドを含むベクターを作製する工程、該ベクターを宿主細胞に導入する工程、および該宿主細胞を培養する工程を含む、抗体の作製方法もまた、提供する。

[0053] また、本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(chimeric)抗体、ヒト化(humanized)抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

[0054] ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region; FR)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択さ

れる。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

[0055] また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる(国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体(scFv)としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を含む適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

[0056] 本発明の抗体は、ヒト白血球抗原(HLA)を認識する、抗体であることが好ましい。本発明におけるヒト白血球抗原(HLA)を認識する抗体は、活性が上昇している点で有用である。ここで、活性とは、抗体が抗原に結合することにより生じる生物学的作用をいう。具体的な例としては、細胞死誘導作用、アポトーシス誘導作用、細胞増殖抑制作用、細胞分化抑制作用、細胞分裂抑制作用、細胞増殖誘導作用、細胞分化誘導作用、細胞分裂誘導作用、細胞周期調節作用などを挙げることができるが、好ましくは細胞死誘導作用、細胞増殖抑制作用である。

[0057] 細胞死誘導作用、細胞増殖抑制作用などの上記作用の対象となる細胞は特に限定されないが、血球系細胞や浮遊細胞が好ましい。血球系細胞の具体的な例としては、リンパ球(B細胞、T細胞)、好中球、好酸球、好塩基球、単球(好ましくは活性化

した末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell、PBMC))、血液腫瘍細胞(ミエローマ細胞、リンパ腫細胞、白血病細胞)などを挙げることができるが、リンパ球(B細胞、T細胞、活性化B細胞、活性化T細胞)が好ましく、特に活性化したB細胞又は活性化したT細胞、および、血液腫瘍細胞が最も好ましい。浮遊細胞とは、細胞を培養した際、細胞がガラスやプラスチックなどの培養器の表面に付着することなく、浮遊状態で増殖する細胞である。本発明において浮遊細胞の好ましい例としては、Jurkat細胞又はARH77細胞を挙げることが出来る。これに対し、接着細胞(付着細胞)とは、細胞を培養した際、ガラスやプラスチックなどの培養器の表面に付着する細胞である。

[0058] 一般的に、全長抗HLA抗体では細胞死誘導活性を増強させる為に抗IgG抗体などでクロスリンクを行ってもよく、クロスリンクは当業者に公知の方法により行うことができる。

[0059] 本発明の抗体が浮遊細胞に対して細胞死を誘導するか否かは、Jurkat細胞又はARH77細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができ、抗体が接着細胞に対して細胞死を誘導するか否かは、HeLa細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができる(WO2004/033499)。

[0060] 本発明においては、上記HLAを認識する抗体を投与することにより、例えば、血液腫瘍(造血器腫瘍)などの腫瘍(具体的な例として、白血病、骨髄異形成症候群、悪性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、形質細胞異常症(骨髄腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症)、骨髄増殖性疾患(真性赤血球増加症、本態性血小板血症、特発性骨髄線維症)など)や自己免疫疾患(具体的な例として、リウマチ、自己免疫性肝炎、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性水疱症、自己免疫性副腎皮質炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性精巣炎、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性レセプター病、自己免疫不妊、クローン病、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、バセドウ病、若年性糖尿病、アジソン病、重症筋無力症、水晶体性ブドウ膜炎、乾癬、ベーチェット病、など)のような疾患の治療、予防などをおこなうことが可能である。また、本発明の抗体は生体内での安定性に優れていると考えられる為、生体に投与する際には特に有効であると考えられる。

[0061] 本発明において、HLAとは、ヒト白血球抗原を意味する。HLA分子はclassIとclassIIに分類され、classIとしてはHLA-A、B、C、E、F、G、H、Jなどが知られており、classIIとしてはHLA-DR、DQ、DPなどが知られている。本発明の抗体が認識する抗原はHLA分子であれば特に制限されないが、好ましくはclassIに分類される分子であり、より好ましくはHLA-IAである。

[0062] 本発明の抗体は、低分子化抗体であってもよい。本発明において低分子化抗体とは、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分が欠損している抗体断片を含み、抗原への結合能を有していれば特に限定されない。本発明の抗体断片は、全長抗体の一部分であれば特に限定されないが、重鎖可変領域(VH)又は軽鎖可変領域(VL)を含んでいることが好ましく、特に好ましいのはVHとVLの両方を含む断片である。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv(シングルチェーンFv)、sc(Fv)₂などを挙げることができるが、好ましくはdiabody (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883、Plickthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenburt 及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994))である。このような抗体断片を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

[0063] 本発明における低分子化抗体は、全長抗体よりも分子量が小さくなることが好ましいが、例えば、ダイマー、トリマー、テトラマーなどの多量体を形成すること等もあり、全長抗体よりも分子量が大きくなることもある。

本発明において好ましい低分子化抗体は、抗体のVHを2つ以上及びVLを2つ以上含み、これら各可変領域を直接あるいはリンカー等を介して間接的に結合した抗

体である。結合は、共有結合でも非共有結合でもよく、また、共有結合と非共有結合の両方でよい。さらに好ましい低分子化抗体は、VHとVLが非共有結合により結合して形成されるVH-VL対を2つ以上含んでいる抗体である。この場合、低分子化抗体中の一方のVH-VL対と他方のVH-VL対との間の距離が、全長抗体における距離よりも短くなる抗体が好ましい。

[0064] 本発明においてscFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリンカーを介して連結される(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

[0065] scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖又は、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖又は、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

[0066] これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

[0067] 本発明において特に好ましい低分子化抗体はdiabodyである。diabodyは、可変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメント(例えば、scFv等)(以下、diabodyを構成するフラグメント)を2つ結合させて二量体化させたものであり、通常、2つのVLと2つのVHを含む(P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993)、EP404097号、WO93/11161号、Johnson et al., Method in Enzymology, 203, 88-98,

(1991)、Holliger et al., Protein Engineering, 9, 299–305, (1996)、Perisic et al., Structure, 2, 1217–1226, (1994)、John et al., Protein Engineering, 12(7), 597–604, (1999)、Holliger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 90, 6444–6448, (1993)、Atwell et al., Mol.Immunol. 33, 1301–1312, (1996))。diabodyを構成するフラグメント間の結合は非共有結合でも、共有結合でよいが、好ましくは非共有結合である。

[0068] また、diabodyを構成するフラグメント同士をリンカーなどで結合して、一本鎖diabody(sc diabody)とすることも可能である。その際、diabodyを構成するフラグメント同士を20アミノ酸程度の長いリンカーを用いて結合すると、同一鎖上に存在するdiabodyを構成するフラグメント同士で非共有結合が可能となり、二量体を形成する。

[0069] diabodyを構成するフラグメントは、VLとVHを結合したもの、VLとVLを結合したもの、VHとVHを結合したもの等を挙げることができるが、好ましくはVHとVLを結合したものである。diabodyを構成するフラグメント中において、可変領域と可変領域を結合するリンカーは特に制限されないが、同一フラグメント中の可変領域の間で非共有結合がおこらない程度に短いリンカーを用いることが好ましい。そのようなリンカーの長さは当業者が適宜決定することができるが、通常2～14アミノ酸、好ましくは3～9アミノ酸、特に好ましくは4～6アミノ酸である。この場合、同一フラグメント上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため、同一鎖上のVLとVHの間で非共有結合がおこらず、単鎖V領域フラグメントが形成されない為、他のフラグメントとの非共有結合による二量体を形成する。さらに、diabody作製と同じ原理で、diabodyを構成するフラグメントを3つ以上結合させて、トリマー、テトラマーなどの多量体化させた抗体を作製することも可能である。

[0070] 本発明におけるdiabodyとしては、配列番号:6に記載のアミノ酸配列を有するdiabodyまたは配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が変異(置換、欠失、挿入、および/または付加)したアミノ酸配列を有するdiabodyであって、配列番号:6に記載の配列を有するdiabodyと機能的に同等なdiabodyや、配列番号:2のCDR(又は可変領域)および配列番号:4のCDR(又は可変領域)のアミノ酸配列を有するdiabodyまたは配列番号:2のCDR(又は可変領域)および配列番号:4のCDR(又は可変領域)のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が

変異(置換、欠失、挿入、および／または付加)したアミノ酸配列を有するdiabodyであって、配列番号:2のCDR(又は可変領域)および配列番号:4のCDR(又は可変領域)の配列を有するdiabodyと機能的に同等なdiabodyを例示できるが、これらに限定されるものではない。

[0071] ここで「機能的に同等」とは、対象となるdiabodyが、配列番号:6に記載の配列を有するdiabody、または配列番号:2のCDR(又は可変領域)および配列番号:4のCDR(又は可変領域)の配列を有するdiabodyと同等の活性(例えば、HLA-Aへの結合活性、細胞死誘導活性など)を有することを意味する。

[0072] 変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内(例えば、3アミノ酸以内)であると考えられる。

[0073] また、配列番号:6に記載のアミノ酸配列を有するdiabodyまたは、配列番号:2のCDR(又は可変領域)および配列番号:4のCDR(又は可変領域)の配列を有するdiabodyを、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的としてヒト化、キメラ化してもよい。

[0074] 配列番号:2に記載されているアミノ酸配列で、1番目～125番目が可変領域に相当し、31番目～35番目がCDR1(配列番号:7)、50番目～66番目がCDR2(配列番号:8)、99番目～114番目がCDR3(配列番号:9)に相当する。配列番号:4に記載されているアミノ酸配列で、1番目～107番目が可変領域に相当し、24番目～34番目がCDR1(配列番号:10)、50番目～56番目がCDR2(配列番号:11)、89番目～97番目がCDR3(配列番号:12)に相当する。

[0075] 本発明においてHLAを認識する低分子化抗体は、HLAに特異的に結合し、生物学的作用を有していれば特に制限されない。本発明の低分子化抗体は、当業者に公知の方法により作製することが可能である。例えば、実施例に記載されているように、HLAを認識する抗体の配列(特に可変領域の配列や相補鎖決定領域(CDR)の配列)を基に、当業者に公知の遺伝子組換え技術を用いて作製することが可能である。

[0076] HLAを認識する抗体の配列は、既に公知の抗体の配列を用いることが可能であり

、又、HLAを抗原として、当業者に公知の方法により抗HLA抗体を作製し、その抗体の配列を取得して用いることも可能である。具体的には、例えば、以下のようにして行うことができる。HLAタンパク質若しくはその断片を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞(ハイブリドーマ)をスクリーニングする。抗原の調製は公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法(WO98/46777など)等に準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法(Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46)等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。その後、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域(V領域)のcDNAを合成し、得られたcDNAの配列を公知の方法により解読すればよい。

[0077] HLAを認識する抗体は、HLAと結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。又、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト化(Humanized)抗体なども使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体等であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

[0078] 本発明者らは、本発明の抗体が細胞死を誘導することを見出した。この知見に基づき、本発明の抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤または細胞増殖抑制剤を提供する。また、既に本発明者らは、抗HLA抗体を低分子化したdiabodyが、ヒト骨髓腫モデル動物に対して、抗腫瘍効果を有することを見出している(WO2004/033499)。さらに、本発明の抗体の細胞死誘導活性は、活性化されたT細胞又はB細胞で特に効果が大きいと考えられる。従って、本発明の抗体は、癌などの腫瘍(特に血液腫瘍)や自己免疫疾患の治療や予防に特に有効であると考えられる。本発明は、

本発明の抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤または自己免疫疾患治療剤もまた提供するものである。

[0079] また、本発明は、本発明の抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤または細胞増殖抑制剤を提供する。本発明の抗体の細胞死誘導活性は、活性化されたT細胞またはB細胞で特に効果が大きいと考えられるので、癌などの腫瘍(特に血液腫瘍)や自己免疫疾患の治療や予防に特に有効であると考えられる。このように本発明は、本発明の抗体を用いた、癌などの腫瘍(特に血液腫瘍)や自己免疫疾患の治療方法や予防方法も提供するものである。低分子化されていない抗体を有効成分として用いる場合には、抗IgG抗体などでクロスリンクすることが好ましい。

[0080] また、本発明の薬剤は、インターフェロンと併用することもできる。抗HLAクラスI抗体とインターフェロンの併用により、細胞死誘導等の抗HLAクラスI抗体の作用を強く増強する(WO2006/123724)。

[0081] 一般に、インターフェロンとは、ウイルス、二本鎖RNA、レクチンなどによって動物細胞から誘発される抗ウイルス作用をもったタンパク質または糖タンパク質の総称である。抗ウイルス作用の他、細胞増殖抑制作用、免疫調節作用を有する。産生細胞、特異的受容体との結合能、生物・物理化学的性質から数種のタイプに分類され、主要なものとしては α 、 β 、 γ があるが、このほか、IFN ω 、IFN τ の存在が知られている。さらにインターフェロン α には、20種以上のサブタイプの存在が知られている。現在、天然型のみならず、PEG化、コンセンサスインターフェロン等の各種遺伝子組み換え型の製剤が開発・上市されている。

[0082] 本発明におけるインターフェロンは、上記タイプのいずれでもよいが、好ましくは α または γ である。また、本発明におけるインターフェロンは、抗HLAクラスI抗体による細胞死誘導を増強する限り、天然型、人工的に変異された遺伝子組み換え型、天然に存在する変異体、融合タンパク質、又はこれらの断片などのいずれであってもよい。本発明におけるインターフェロンの由来に特に制限はなく、例えば、ヒト、チンパンジー、オランウータン、イヌ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ロバ、ブタ、ネコ、マウス、モルモット、ラット、ウサギなどを由来とすることができるが、これらに限らずその他の哺乳動物を由来とすることができる。好ましくはヒト由来のインターフェロンである。

[0083] 本発明において本発明の抗体とインターフェロンとの併用とは、本発明の抗体とインターフェロンを共に投与または使用(以下、単に「投与」と記載する。)することを意味し、投与の順番や投与間隔などで限定されるものではない。本発明の抗体とインターフェロンの投与の順番は、インターフェロン投与後に本発明の抗体を投与、インターフェロンと本発明の抗体を同時に投与、本発明の抗体投与後にインターフェロンを投与、のいずれの順番でもよいが、好ましくはインターフェロン投与後に本発明の抗体を投与またはインターフェロンと本発明の抗体を同時に投与することであり、さらに好ましくはインターフェロン投与後に本発明の抗体を投与することである。

インターフェロン投与後に本発明の抗体を投与する場合、インターフェロンと本発明の抗体の投与間隔は特に限定されず、投与経路や剤形等の要因を考慮して設定することができる。あえて投与間隔の一例を挙げるとすれば、通常、0時間～72時間であり、好ましくは0時間～24時間であり、さらに好ましくは0時間～12時間である。

本発明の抗体はインターフェロンとともに一つの医薬組成物とすることができる。また、本発明の抗体は、インターフェロンと併用することを特徴とする、医薬組成物とすることができる。

[0084] 本発明の薬剤は、医薬品の形態で投与することが可能であり、経口的または非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができる。患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.01mgから100mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1～1000mg、好ましくは5～50mgの投与量を選ぶことができる。好ましい投与量、投与方法は、たとえばHLAを認識する抗体の場合には、血中にフリーの抗体が存在する程度の量が有効投与量であり、具体的な例としては、体重1kgあたり1ヶ月(4週間)に0.5mgから40mg、好ましくは1mgから20mgを1回から数回に分けて、例えば2回/週、1回/週、1回/2週、1回/4週などの投与スケジュールで点滴などの静脈内注射、皮下注射などの方法で、投与する方法などである。投与スケジュールは、投与後状態の観察および血液検査値の動向を観察しながら2回/週あるいは1回/週から1回/2週、1回/3週、1回/4週のように投与間隔を延ばしていくなど調整す

ることも可能である。

- [0085] 本発明の薬剤には、保存剤や安定剤等の製剤上許容しうる担体を添加してもよい。製剤上許容しうる担体とは、それ自体は上記の活性を有する材料であってもよいし、有さない材料であってもよく、上記の薬剤とともに投与可能な製剤上許容される材料を意味する。また、上記の活性を有さない材料であっても、抗HLA抗体と併用することによって相乗的もしくは相加的な効果を有する材料であってもよい。

製剤上許容される材料としては、例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤、キレート剤(EDTA等)、結合剤等を挙げることができる。

- [0086] 本発明において、安定剤としては、0.2%程度のゲラチンやデキストラン、0.1-1.0%のグルタミン酸ナトリウム、あるいは約5%の乳糖や約2%のソルビトールなどを使用することが出来るが、これらに限定されるものではない。保存剤としては、0.01%程度のチメロサルや0.1%程度のベータプロピオノラクトン等を典型的例として挙げることができる。

- [0087] 本発明において、界面活性剤としては非イオン界面活性剤を挙げることができ、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリステート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリルモノステアレート、デカグリセリルジステアレート、デカグリセリルモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシ

エチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリオキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のHLB6～18を有するもの、等を典型的例として挙げることができる。

[0088] また、界面活性剤としては陰イオン界面活性剤も挙げることができ、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10～18のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2～4でアルキル基の炭素原子数が10～18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8～18のアルキルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数12～18の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げることができる。

[0089] 本発明の薬剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせることで添加することができる。本発明の製剤で使用する好ましい界面活性剤は、ポリソルベート20、40、60又は80などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、ポリソルベート20及び80が特に好ましい。また、ポロキサマー（プルロニックF-68（登録商標）など）に代表されるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールも好ましい。

界面活性剤の添加量は使用する界面活性剤の種類により異なるが、ポリソルベート20又はポリソルベート80の場合では、一般には0.001～100mg/mLであり、好ましくは0.003～50mg/mLであり、さらに好ましくは0.005～2mg/mLである。

[0090] 本発明において緩衝剤としては、リン酸、クエン酸緩衝液、酢酸、リンゴ酸、酒石

酸、コハク酸、乳酸、リン酸カリウム、グルコン酸、カプリル酸、デオキシコール酸、サリチル酸、トリエタノールアミン、フマル酸、他の有機酸等、あるいは、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、ヒスチジン緩衝液、イミダゾール緩衝液等を挙げることが出来る。

[0091] また溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって溶液製剤を調製してもよい。緩衝液の濃度は一般には1～500mMであり、好ましくは5～100mMであり、さらに好ましくは10～20mMである。

[0092] また、本発明の薬剤は、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、アミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、糖アルコールを含んでいてもよい。

[0093] 本発明においてアミノ酸としては、塩基性アミノ酸、例えばアルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン等、またはこれらのアミノ酸の無機塩（好ましくは、塩酸塩、リン酸塩の形、すなわちリン酸アミノ酸）を挙げることが出来る。遊離アミノ酸が使用される場合、好ましいpH値は、適当な生理的に許容される緩衝物質、例えば無機酸、特に塩酸、リン酸、硫酸、酢酸、蟻酸又はこれらの塩の添加により調整される。この場合、リン酸塩の使用は、特に安定な凍結乾燥物が得られる点で特に有利である。調製物が有機酸、例えばリンゴ酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸等を実質的に含有しない場合あるいは対応する陰イオン（リンゴ酸イオン、酒石酸イオン、クエン酸イオン、コハク酸イオン、フマル酸イオン等）が存在しない場合に、特に有利である。好ましいアミノ酸はアルギニン、リジン、ヒスチジン、またはオルニチンである。さらに、酸性アミノ酸、例えばグルタミン酸及びアスパラギン酸、及びその塩の形（好ましくはナトリウム塩）あるいは中性アミノ酸、例えばイソロイシン、ロイシン、グリシン、セリン、スレオニン、バリン、メチオニン、システイン、またはアラニン、あるいは芳香族アミノ酸、例えばフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、または誘導体のN-アセチルトリプトファンを使用することもできる。

[0094] 本発明において、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物としては、例えばデキストラン、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、スクロース、トレハロース、ラフィノース等を挙げることができる。

[0095] 本発明において、糖アルコールとしては、例えばマンニトール、ソルビトール、イノ

シトール等を挙げることができる。

- [0096] 注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50)等と併用してもよい。

所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、pH調整剤、無痛化剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。

- [0097] 本発明において、含硫還元剤としては、例えば、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数1～7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等を挙げることができる。

- [0098] また、本発明において酸化防止剤としては、例えば、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシルエーテル、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤を挙げることが出来る。

- [0099] また、必要に応じ、マイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる("Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed., 1980等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明に適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 1981, 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98-105; 米国特許第3,773,919号; 欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 1983, 22: 547-556; EP第133,988号)。

使用される製剤上許容しうる担体は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組

合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

[0100] 注射剤を調製する場合、必要により、pH 調製剤、緩衝剤、安定化剤、保存剤等を添加し、常法により、皮下、筋肉内、静脈内注射剤とする。注射剤は、溶液を容器に収納後、凍結乾燥等によって、固形 製剤として、用時調製の製剤としてもよい。また、一投与量を容器に収納してもよく、また、複数投与量を同一の容器に収納してもよい。

[0101] 本発明の薬剤の投与方法としては、公知の種々の方法が使用できる。

本発明において、「投与する」とは、経口的、あるいは非経口的に投与することが含まれる。経口的な投与としては、経口剤という形での投与を挙げることができ、経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。

[0102] 非経口的な投与としては、注射剤という形での投与を挙げることができ、注射剤としては、点滴などの静脈注射、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を挙げることができる。また、投与すべきオリゴヌクレオチドを含む遺伝子を遺伝子治療の手法を用いて生体に導入することにより、本発明の方法の効果を達成することができる。また、本発明の薬剤を、処置を施したい領域に局所的に投与することもできる。例えば、手術中の局所注入、カテーテルの使用、または本発明の阻害剤をコードするDNAの標的化遺伝子送達により投与することも可能である。

[0103] 患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

[0104] 本発明の薬剤の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人(体重60kgとして)においては、1日あたり約0.1から1000mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0か

ら20mgであると考えられる。

[0105] 非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人(体重60kgとして)においては、通常、1日当たり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

[0106] どの接種方法が適切かは薬剤の種類、接種する対象の種類等を考慮して決定される。容器はバイアル、プレフィルド シリンジ製品 (pre-filled syringe) が可能である。必要に応じて、溶液状でも凍結乾燥などによる粉末製品でもよい。一回接種用でも複数回接種用でも良い。投与量は、接種する対象の種類や体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

なお本明細書において引用されたすべての特許、公開特許公報、および公開文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0107] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕 HLA classI A/ β 2M発現Ba/F3細胞株の樹立

ヒトHLA classI Aと、ヒト β 2Mを発現するBa/F3細胞の樹立を行った。

まず全長HLA classI A (HLA-full) 発現ベクター作製を以下の通り実施した。全長HLA classI AをコードするcDNAを鋳型にして以下のプライマー (sHLA-1, fHLA-3') でPCRを行い、全長HLA classI Aをコードする遺伝子断片を増幅した。

sHLA-1: TCC GAA TTC CAC CAT GGC CGT CAT GGC GCC CCG AAC (配列番号:13)

fHLA-3': TTG CGG CCG CTC ACA CTT TAC AAG CTG TGA GAG ACA (配列番号:14)

得られたDNA断片をEcoRI/NotIで切断し、動物細胞発現ベクターpCXND3のEco

RI/NotI間に挿入し全長HLA classI A (fHLA-A) 発現ベクター (pCXND3-HLA-full) を構築した。

[0108] 次に、全長 β 2-microglobulin (β 2M) 発現ベクターを以下の通り作製した。ヒト脾臓由来cDNA (human spleen cDNA, clontech #S1206) を鋳型にして以下のプライマー (β 2M -1, β 2M -2) でPCRを行い、全長 β 2Mをコードする遺伝子断片を増幅した。

β 2M -1: AAG CGG CCG CCA CCA TGT CTC GCT CCG TGG C (配列番号: 15)

β 2M -2: TTT CTA GAT TAC ATG TCT CGA TCC CAC TTA ACT (配列番号: 16)

得られたDNA断片をNotI/XbaIで切断し、pCOS2-ZEOのNotI/XbaI間に挿入し全長 β 2M 発現ベクター (pCOS2zeo- β 2M) を構築した。

[0109] 続いてHLA-A/ β 2M発現Ba/F3細胞株の樹立を以下のとおり行った。pCXND3-HLA-full、pCOS2zeo- β 2M各20 μ gをPvuIで切断し、PBS(-)に懸濁したBa/F3細胞 (1×10^7 cells/mL, 800 μ L) にエレクトロポレーション法 (BIO-RAD社 GenePulser、0.33kV、950 μ F、time const 27.0) により導入した。生育培地 (RPMI1640 + 10% FCS + P/S + 1 ng/mL IL-3) で適当な細胞数に希釈した後、96ウェルプレートに撒き、翌日G418を400 μ g/mL、Zeocinを800 μ g/mLになるように添加した。その後3~4日おきに半分ずつ培地を交換し、10日後に単一クローンを選別した。

[0110] 得られたHLA-A/ β 2M発現Ba/F3細胞株 (#9, #10, #22)、および、ARH77細胞のHLA classI Aの発現量を2D7 IgG (10 μ g/mL) で染色し、各抗原の細胞膜上での発現をFACS (コールター, ELITE) にて解析した (図1)。その結果、#9の株でARH77細胞と同程度のHLA classI Aの発現が認められた。そこで、この株を1 ng/mL IL-3, 500 μ g/mL G418, 800 μ g/mL zeocin (invitrogen #46-0072)、10%FCSを含むRPMI1640培地で拡大培養し、細胞免疫用に用いた。

[0111] 〔実施例2〕 細胞免疫

HLA-A/ β 2M発現Ba/F3細胞株 (BaF-HLA #9) をPBS(-)で2回洗浄し、 $1.5 \sim 2.0 \times 10^7$ cells/200 μ LになるようにPBS(-)に懸濁し、この懸濁液200 μ Lをマウス (MRL/1

pr、オス、4週齢、日本チャールスリバー)の腹腔内に注入し免疫した(テルモシリンジ 1 mL、針26G)。

1週間に1回、計8回免疫し、9回目は 2.5×10^7 cells/200 μ Lの懸濁液200 μ Lを最終免疫し、4日後に細胞融合を行った。

[0112] 〔実施例3〕 ハイブリドーマの作成

マウスより脾臓を無菌的に摘出し、medium 1 [RPMI1640(+P/S)]中でつぶして単一細胞懸濁液にした。これを70 μ mのナイロンメッシュ (Falcon)に通して脂肪組織等を取り除き、細胞数をカウントした。得られたB細胞をマウスミエローマ細胞 (P3U1細胞)と、およそ2:1の細胞数比になるように混合し、1 mLの50% PEG (Roche, cat #: 783 641, lot #: 14982000)を加えて、細胞融合を行った。融合した細胞をmedium 2 [RPMI1640(+P/S, 10% FCS)]に懸濁し、適当枚数(10枚)の96ウェルプレートに100 μ L/ウェルで分注し、37°Cで培養した。翌日、medium 3 [RPMI1640(+P/S, 10% FCS, HAT(Sigma, H0262), 5% BM condimed H1 (Roche, cat #: 1088947, lot #: 14994800))]を100 μ L/ウェル加え、以後、毎日ウェルから培地100 μ Lを除き、新たにmedium 3を100 μ L/ウェル加える作業を4日間行った。

[0113] 〔実施例4〕 細胞死誘導抗体のスクリーニング

細胞融合から約1週間後に細胞死誘導活性を有するハイブリドーマのスクリーニングを行った。細胞死誘導抗体のスクリーニングは、細胞凝集誘導能を指標にして以下のとおり行った。

HLA-A/ β 2M発現Ba/F3細胞を 2.5×10^4 cells/wellで96ウェルプレートに播種し、各ハイブリドーマの培養上清80 μ Lを加え37°Cで1時間培養した。その後、抗マウスIgG抗体 (Cappel # 55482, #55459)を6 μ g/mLとなるように加えた。さらに4時間培養してクロスリンク反応を行った後、顕微鏡で観察し、細胞凝集の観察されるウェルを選択した。1000クローン分の培養上清をスクリーニングした結果、最終的に10個の陽性ハイブリドーマを得た。これら陽性ウェルの細胞を2.5 cells/wellとなるように96ウェルプレートに播種しなおして約10日間培養し、再び細胞凝集誘導活性を解析した。この操作により10種類の単一クローンを得た。

[0114] 〔実施例5〕 抗体のパネル化

5-1. 抗体の精製

得られたクローンのハイブリドーマの培養上清80 mLからHi Trap Protein G HP 1 mLカラム(Amersham Biosciences #17-0404-01)を用いて抗体を精製した。ハイブリドーマ上清を流速1 mL/minで吸着させ、20 mLの20 mM リン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄した後、3.5 mLの0.1 M Glycine-HCl (pH2.7)で溶出した。溶出分画は、あらかじめ1 M Tris-HCl (pH9.0)を50 μ L ずつ加えたエッペンドルフチューブに0.5mLずつ回収した。OD_{280nm}を測定し、抗体が含まれている分画をまとめ、PBS(-)を加えて全量2.5 mLとした後、PD-10カラム(Amersham Biosciences #17-0851-01)を用いてPBS(-)にバッファー置換した。精製した抗体は0.22 μ mフィルター(MILLIPORE #SLGV033RS)を通し、以下詳細に各精製抗体の性質について検討を行った。

[0115] 5-2. サブタイプの決定

抗体のサブタイプ決定はIsoStrip (Roche #1 493 027)を用いて行った。サブタイプ決定にはPBS(-)で10倍希釈したハイブリドーマの培養上清を用いた。

[0116] 5-3. エピトープ解析

5-3-1. マウスMHC class IA遺伝子のクローニング

得られた抗体がHLA class I A分子上のどのドメインを認識しているかを解析するため、HLA class I Aの各種ドメイン(α 1ドメイン, α 2ドメイン, α 3ドメイン)をそれぞれ、マウスMHC class Iの対応するドメインに置き換えたキメラHLA class I Aを発現する細胞株の樹立を以下のとおり行った(図2)。

まずマウスMHC class IA遺伝子を鋳型にし、以下の方法でクローニングした。

Mouse spleen cDNA (MTC panel, clontech)に対して、以下のプライマー(mHLA-1およびmHLA-2)により、pyrobest DNA polymerase (TAKARA#R005)でPCRを行い、マウスHLA class I Aの遺伝子断片を増幅した。

mHLA-1: CTG CTC CTG CTG TTG GCG GC (配列番号:17)

mHLA-2: CAG GGT GAG GGG CTC AGG CAG (配列番号:18)

得られた遺伝子断片を、pCRII-TOPO (Invitrogen TOPO TA-cloning kit, #45-0640)にTA-cloningし、塩基配列を確認した。

[0117] 5-3-2. エピトープ解析用キメラHLA-A発現ベクターの構築

続いて、エピトープ解析用キメラHLA-A発現ベクターの構築を以下のとおり実施した。

HLA-Aの α 1ドメインがマウス(MHH)であるMHH発現ベクター(pCOS2-chHLA-MHH flag)は以下の方法で構築した。

全長HLA-Aを有する発現ベクター(pCXND3-HLA full)を鋳型にしてpyrobest DNA polymerase (TAKARA#R005)を用い、以下のプライマー(sHLA-AおよびchHLA-H1)により、HLA-Aのsignal 配列(断片A)をPCR増幅した。

sHLA-A: TCC GAA TTC CAC CAT GGC CGT CAT GGC GCC CCG AAC (EcoRIサイトを含む)(配列番号:19)

chHLA-H1: AAT CTA GAC TGG GTC AGG GCC AGG GCC CC (XbaIサイトを含む)(配列番号:20)

[0118] また、以下のプライマー(chHLA-H2およびchHLA-H3)により、HLA-Aの α 2ドメイン-終始コドンまでの配列(断片B)をPCR増幅した。

chHLA-H2: TTT CTA GAG CCG GTT CTC ACA CCA TCC AGA GG (XbaIサイトを含む)(配列番号:21)

chHLA-H3: AAG GAT CCC ACT TTA CAA GCT GTG AGA GAC ACA T (BamHIサイトを含む)(配列番号:22)

断片AをEcoRI-XbaIで、断片BをXbaI-BamHIでそれぞれ切断し、これらをpCOS2-FLAGのEcoRI-BamHI間に挿入した。得られたプラスミドの塩基配列を確認し、pCOS2-(M)HHとした。

[0119] 同時に、マウスMHC class IA遺伝子を鋳型にして、pyrobest DNA polymerase (TAKARA#R005)を用い、以下のプライマー(chHLA-M1およびchHLA-M2)により、マウスMHC class IAの α 1ドメイン(断片C)をPCR増幅した。

chHLA-M1: TTT CTA GAG CGG GCC CAC ATT CGC TGA GG (XbaIサイトを含む)(配列番号:23)

chHLA-M2: TTT CTA GAC TGG TTG TAG TAT CTC TGT GCG GTC C (XbaIサイトを含む)(配列番号:24)

得られた断片CをXbaIで切断し、XbaIで開いたpCOS2-(M)HHに挿入した。塩基

配列を確認し、 α 1ドメインをマウスMHC-Aに置換した発現ベクターpCOS2-chHLA-MHH-flagの構築を終了した。

- [0120] α 2ドメインがマウス (HMH)であるHMH発現ベクター (pCOS2-chHLA-HMH flag) は以下の方法で構築した。

全長HLA-Aを有する発現ベクター (pCXND3-HLA full)を鋳型にしてpyrobest DNA polymerase (TAKARA#R005)を用い、以下のプライマー (sHLA-AおよびchHLA-H4) により、HLA-Aのsignal 配列- α 1ドメイン (断片D) をPCR増幅した。

sHLA-A: TCC GAA TTC CAC CAT GGC CGT CAT GGC GCC CCG AAC (EcoRIサイトを含む) (配列番号:19)

chHLA-H4: TTG TCG ACC CGG CCT CGC TCT GGT TGT AGT AG (Sallサイトを含む) (配列番号:25)

- [0121] また、以下のプライマー (chHLA-H5およびchHLA-H3) により、HLA-Aの α 3ドメイン-終始コドンまで (断片E) をPCR増幅した。

chHLA-H5: AAG TCG ACG CCC CCA AAA CGC ATA TGA CT (Sallサイトを含む) (配列番号:26)

chHLA-H3: AAG GAT CCC ACT TTA CAA GCT GTG AGA GAC ACA T (BamHIサイトを含む) (配列番号:22)

断片DをEcoRI-Sallで、断片EをSall-BamHIでそれぞれ切断し、これらをpCOS2-FLAGのEcoRI-BamHI間に挿入した。得られたプラスミドの塩基配列を確認し、pCOS2-H(M)Hとした。

- [0122] 同時に、マウスMHC class IA遺伝子を鋳型にして、pyrobest DNA polymerase (TAKARA # R005)を用い、以下のプライマー (chHLA-M3およびchHLA-M4) により、マウスMHC class IAの α 2ドメイン(断片F) をPCR増幅した。

chHLA-M3: TTG TCG ACC ACG TTC CAG CGG ATG TTC GGC (Sallサイトを含む) (配列番号:27)

chHLA-M4: GAG TCG ACG CGC AGC AGC GTC TCA TTC CCG (Sallサイトを含む) (配列番号:28)

得られた断片FをSallで切断し、Sallで開いたpCOS2-H(M)Hに挿入した。塩基配

列を確認し、 α 2ドメインをマウスMHC-Aに置換した発現ベクターpCOS2-chHLA-H MH-flagの構築を終了した。

- [0123] α 3ドメインがマウス (HHM)であるHHM発現ベクター (pCOS2-chHLA-HHM flag) は以下の方法で構築した。

全長HLA-Aを有する発現ベクター (pCXND3-HLA full)を鋳型にしてpyrobest DNA polymerase (TAKARA#R005)を用い、以下のプライマー (sHLA-AおよびchHLA-H6) により、HLA-Aのsignal 配列- α 2ドメイン (断片G) をPCR増幅した。

sHLA-A: TCC GAA TTC CAC CAT GGC CGT CAT GGC GCC CCG AAC (EcoRIサイトを含む) (配列番号:19)

chHLA-H6: TTT CTA GAG TCC GTG CGC TGC AGC GTC TCC T (XbaIサイトを含む) (配列番号:29)

- [0124] また、以下のプライマー (chHLA-H7およびchHLA-H3) により、HLA-Aの細胞内ドメイン (断片H) をPCR増幅した。

chHLA-H7: TTT CTA GAA TGG GAG CCG TCT TCC CAG CCC A (XbaIサイトを含む) (配列番号:30)

chHLA-H3: AAG GAT CCC ACT TTA CAA GCT GTG AGA GAC ACA T (BamHIサイトを含む) (配列番号:22)

- [0125] 断片GをEcoRI-XbaIで、断片HをXbaI-BamHIでそれぞれ切断し、これらをpCOS2-FLAGのEcoRI-BamHI間に挿入した。得られたプラスミドの塩基配列を確認し、pCOS2-HH(M)とした。

同時に、マウスMHC class IA遺伝子を鋳型にして、pyrobest DNA polymerase (TAKARA # R005)を用い、以下のプライマー (chHLA-M5およびchHLA-M6) により、マウスMHC class IAの α 3ドメイン(断片I) をPCR増幅した。

chHLA-M5: AAT CTA GAA AGG CCC ATG TGA CCT ATC ACC CC (XbaIサイトを含む) (配列番号:31)

chHLA-M6: TAT CTA GAG TGA GGG GCT CAG GCA GCC CC (XbaIサイトを含む) (配列番号:32)

得られた断片IをXbaIで切断し、XbaIで開いたpCOS2-HH(M)に挿入した。塩基配

列を確認し、 α 3ドメインをマウスMHC-Aに置換した発現ベクターpCOS2-chHLA-HM-flagの構築を終了した。

- [0126] α 1～ α 3ドメインがマウス (MMM) であるMMM発現ベクター (pCOS2-chHLA-MMM flag) は以下の方法で構築した。

断片AをEcoRI-XbaIで、断片HをXbaI-BamHIでそれぞれ切断し、これらをpCOS2-FLAGのEcoRI-BamHI間に挿入した。得られたプラスミドの塩基配列を確認し、pCOS2-(MMM)とした。

マウスMHC class IA遺伝子を鋳型にして、pyrobest DNA polymerase (TAKARA #R005)を用い、以下のプライマー (chHLA-M1およびchHLA-M6) により、マウスMHC class IAの α 1～ α 3ドメイン (断片J) をPCR増幅した。

chHLA-M1: TTT CTA GAG CGG GCC CAC ATT CGC TGA GG (XbaIサイトを含む)(配列番号:23)

chHLA-M6:TAT CTA GAG TGA GGG GCT CAG GCA GCC CC(XbaIサイトを含む) (配列番号:32)

得られた断片JをXbaIで切断し、XbaIで開いたpCOS2-(MMM)に挿入した。塩基配列を確認し、 α 1～ α 3ドメインをマウスMHC-Aに置換した発現ベクターpCOS2-chHLA-MMM-flagの構築を終了した。

- [0127] 5-3-3. エピトープ解析用キメラHLA-A/ β 2M発現Ba/F3細胞株の樹立

pCOS2-chHLA-MHH-flag、pCOS2-chHLA-HMH-flag、pCOS2-chHLA-HHM-flag、pCOS2-chHLA-MMM-flag各20 μ gをPvuIで切断し、PBS(-)に懸濁したBa/F3細胞(1×10^7 cells/mL, 800 μ L) にエレクトロポレーション法 (BIO-RAD社 GenePulser、0.33 kV、950 μ F、time const 27.0) により導入した。生育培地 (RPMI1640 + 10% FCS + P/S + 1 ng/mL IL-3) で適当な細胞数に希釈した後、96ウェルプレートに播種し、翌日G418を500 μ g/mLになるように添加した。10日後に単一クローンを顕微鏡下で選別した。

- [0128] これらのクローンについて、 1×10^5 個の細胞を0.5% NP40 Lysis buffer (0.5% NP40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl (pH7.5)) 50 μ Lに溶解し、上清12 μ Lを用いてSDS-PAGEを行った。PVDF膜にブロッティング後、Anti-Flag M2抗

体(SIGMA #F3165)、HRP-抗マウス抗体(Amersham Biosciences #NA9310)でウェスタンブロットを行い、chHLAを産生する細胞株のスクリーニングを行った。chHLAの発現がもっとも高かったchHLA-MHH #8、chHLA-HMH #6、chHLA-HHM #2、chHLA-MMM #4を選び、1 ng/mL IL-3, 500 μ g/mL G418, 10% FCSを含むRPMI1640培地で拡大培養した。さらに、これらのchHLA発現細胞株へPvuIで切断したpCOS2zeo- β 2M各15 μ gをエレクトロポレーション法で導入した。翌日G418を500 μ g/mL、Zeocin (Invitrogen #46-0072)を800 μ g/mLになるように添加した。12日後に単一クローンを顕微鏡下で選別した。これらの細胞を抗ヒト β 2M抗体(SIGMA # M7398)と抗マウスIgG-FITC抗体(Beckman Coulter # IM0819)で染色し、 β 2Mの細胞膜上での発現をFACS(Beckman Coulter, ELITE)にて解析した。 β 2Mの発現が最も高かったchHLA-MHH/ β 2M #1-3、chHLA-HMH/ β 2M #2-1、chHLA-HHM/ β 2M #3-4、chHLA-MMM/ β 2M #4-6を1 ng/mL IL-3, 500 μ g/mL G418, 800 μ g/mL zeocin, 10% FCSを含むRPMI1640培地で拡大培養し、エピトープ解析に使用した。

[0129] 5-3-4. FACSによるエピトープ解析

得られた抗体(10クローン)のエピトープを決めるため、これらキメラHLA/ β 2M発現細胞に対する結合能を解析した。キメラHLA/ β 2M発現細胞を 8×10^5 cells/wellずつ96ウェルプレートに播種し、各抗体を10 μ g/mLとなるように添加した。氷上で1時間インキュベートしたのちFACS buffer 150 μ Lで細胞を洗浄し、抗マウスIgG-FITC抗体(Beckman Coulter # IM0819)で染色した後、FACS(Beckman Coulter, ELITE)にて解析した(図3)。

その結果、C3B3、C11B9、C17D11はHMH/Ba/F3(α 2ドメインがマウスHLA)には結合しなかったことから、エピトープが α 2ドメインであることが分かった。一方、C17A4, C17E9, C23H12, C26D8は、マウスMHC class IIには交差しないものの(結果を示さず)、すべてのキメラHLAに結合し、そのFACS染色パターンが抗 β 2M抗体による染色パターンと一致していたことから、これらのクローンは、HLAではなく β 2Mに反応していると判断された。C7C5, C20D4は、HMH(α 2ドメインがマウス)、HHM(α 3ドメインがマウス)のHLAには結合しなかったことから、これらクローンは α 2 \sim α 3の間を認識していることが推測された。

[0130] 5-4. 細胞死誘導活性

得られた抗体のARH77細胞に対する細胞死誘導活性の評価を以下のとおり行った。ARH77細胞に精製した各抗体(5 μ g/ml)を添加後、二次抗体(抗マウスIgG抗体、Cappel # 55482, #55459)存在下(120 μ g/ml)、または非存在下で37°C4時間培養した。培養後、細胞を回収しpropidium iodide (PI)染色を行いFACS(Beckman Coulter, ELITE)にてPI陽性細胞(死細胞)の割合を測定した(図4)。

その結果、C3B3, C17D11, C11B9抗体においてクロスリンク存在下で比較的強い細胞死誘導活性が認められた。

[0131] 5-5. 可変領域のクローニング

ハイブリドーマ約5 x 10⁶個からRNeasy Mini Kit (QIAGEN #74104)およびQIAshredder (QIAGEN #79654)を用いてtotal RNAを精製した。total RNA 1 μ gからSMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH #PT3269-1)を用いてcDNAを合成した。その際、キットに含まれる5'-CDSプライマーを使用した。得られたcDNAを鋳型にして以下の条件でPCRを行って重鎖可変領域(V_H)、軽鎖可変領域(V_L)を増幅した。

Primer: UPM \longleftrightarrow G2a (V_H; IgG2a), UPM \longleftrightarrow k (V_L; k)

94°C for 5 sec, 72°C for 2min, 5 cycles

94°C for 5 sec, 70°C for 10 sec, 72°C for 2min, 5 cycles

94°C for 5 sec, 68°C for 10 sec, 72°C for 2min, 27 cycles

得られた遺伝子断片をpCRII-TOPO (Invitrogen TOPO TA-cloning kit, #45-0640)にTA-cloningし、塩基配列を確認した。1つの遺伝子に対してプラスミドを最低2個以上解析して、配列を確認した。本実施例において確認されたリーダー配列を含む重鎖可変領域の塩基配列を配列番号:46に、本塩基配列がコードする重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号:47に示す。配列番号:46の58番目から432番目の塩基配列(配列番号:1)、および配列番号:47の20番目から144番目のアミノ酸配列(配列番号:2)が重鎖可変領域に相当する。

また、本実施例において確認されたリーダー配列を含む軽鎖可変領域の塩基配列を配列番号:48に、本塩基配列がコードする軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号:49に示す。配列番号:48の61番目から381番目の塩基配列(配列番号:3)、

および配列番号:49の21番目から127番目のアミノ酸配列(配列番号:4)が軽鎖可変領域に相当する。

[0132] 5-6. 抗体パネルの作成

以上得られた抗体に関して、抗体のアイソタイプ分類、抗体の可変領域をコードする遺伝子配列、さらに、エピトープ、ARH77細胞への結合活性、細胞死誘導活性などの情報を加え、パネル化してまとめた(表1)。

可変領域をコードするアミノ酸配列を分析した結果、 α 2ドメインをエピトープに持つ3クローン(C3B3, C17D11, C11B9)の重鎖可変領域はC3B3, C17D11は同一のアミノ酸を有していたが、C11B9は、C3B3/ C17D11と比べて1アミノ酸異なっていた(図5-1)。また、軽鎖可変領域は、3クローンともまったく同一の配列であった(図5-2)。

。

[0133] [表1]

グループ	クローン ID	マウス 系統	アイソタイプ	エピトープ	ARH77 への結合 (Xモード)	細胞死誘導 (死細胞の割合(%))	
						クロスリンク(-)	クロスリンク (+)
	2D7	Balb/c	IgG2b	α 2	98.8	33.4	63.6
A	C3B3	MRL/lpr	IgG2a	α 2	74	14.3	47.7
	C17D11	MRL/lpr	IgG2a	α 2	82	8.5	53.1
	C11B9	MRL/lpr	IgG2a	α 2	71	10.2	51.1
B	C23H12	MRL/lpr	IgG2a	β 2M	69.6	4.8	42.3
	C26D8	MRL/lpr	IgG2a	β 2M	66.5	11.2	45.1
	C17E9	MRL/lpr	IgG2a	β 2M	69.6	8.7	32
	C17A4	MRL/lpr	IgG2a	β 2M	11.6	4.2	10.4
C	C20D4	MRL/lpr	IgG2a	α 2/3	14.2	4.4	4.7
	C7C5	MRL/lpr	IgG1/2a	α 2/3	7.8	4	4.8
D	C14C7	MRL/lpr	IgG1	?	2.9	3.8	5.2

[0134] [実施例6] diabody化

6-1. diabodyベクターの作成

得られたC3B3抗体は、二次抗体(GAM)存在下ではARH77細胞に対して細胞死誘導活性が認められたものの、抗体単独では強い細胞死誘導活性は認められなかった。そこで、C3B3抗体の可変領域を5 merのペプチド(GGGGS)(配列番号:33)で連結させたdiabodyの作成を行った。

[0135] pCRII-TOPOにTA-cloningしたV_Hを鋳型にしてpyrobest DNA polymerase (TAKA

RA#R005)を用いてPCRを行い、H鎖可変領域のシグナル配列からFR4までを増幅させた。5'側のプライマーにはEcoRIサイトを、3'側のプライマーにはリンカー配列(アミノ酸GGGGS)を付加したものをを用いた。

同様にpCRII-TOPOにTA-cloningした V_L を鋳型にしてPCRを行い、L鎖可変領域のFR1からFR4までを増幅させた。5'側のプライマーにはリンカー配列(アミノ酸:GGGGS)を、3'側のプライマーにはFlagタグとNotIサイトを付加したものをを用いた。

[0136] 増幅した V_H 、 V_L 同士をアニールさせてから、両端のプライマーでPCRを行ってdiabodyの遺伝子を増幅した。得られた断片をEcoRI/NotIで切断し、pCXND3のEcoRI/NotI間に挿入して塩基配列を確認し、発現ベクターの構築を終了した。以下にC3B3 diabody (リンカー: 5アミノ酸)を作製したときのプライマーとPCR反応条件を示す。

プライマー:

C3B3DB-H1: cct gaa ttc CAC CAT GTA CTT CAG GCT CAG CTC AG (配列番号:34)

C3B3DB-H2: GGA TAT Cgc tac cgc ctc cac cTG AGG AGA CGG TGA CTG AA TTC CTT (配列番号:35)

C3B3DB-L1: CAg gtg gag gcg gta gcG ATA TCC AGA TGA CAC AGA CTA C AT CCT CC (配列番号:36)

C3B3DB-L2: att gcg gcc gct tat cac tta tcg tcg tca tcc ttg tag tcT TTT ATT T CC AGC TTG GTC CCC GAT CCG (配列番号:37)

PCR反応条件:

94°C 1分

94°C 30分、72°C 30分、25 cycles

[0137] 次に、得られたPCR産物をS-300 HRカラム(Amersham Biosciences #27-5130-01)で精製して、 V_H 、 V_L 各々1 μ Lずつpyrobest DNA polymeraseを用いて以下の条件でアニールさせた。

94°C 1分

94°C 30分、72°C 30分、5 cycles

アニール後の反応液1 μ LをC3B3DB-H1、C3B3DB-L2より短いプライマーC3B3

DB-5'、C3B3DB -3'を用いて以下の条件でPCRを行った。

C3B3DB-5': cct gaa ttc CAC CAT GTA CTT CAG GC (配列番号:38)

C3B3DB-3': att gcg gcc gct tat cac tta tcg (配列番号:39)

94°C 1分

94°C 30分、72°C 1分、25 cycles

増幅した断片をS-400 HRカラム(Amersham Biosciences #27-5140-01)で精製して、EcoRI/NotIで切断し、pCXND3のEcoRI/NotI間に挿入して、塩基配列を確認して、pCXND3-C3B3DB-Flagの構築を終了した。本実施例において確認されたリーダー配列およびFlag-tag配列を含むdiabodyの塩基配列を配列番号:50に、本塩基配列がコードするdiabodyのアミノ酸配列を配列番号:51に示す。配列番号:50の58番目から432番目の塩基配列が重鎖可変領域、433番目から447番目の塩基配列がリンカー配列、448番目から768番目の塩基配列が軽鎖可変領域に相当する。また、配列番号:51の20番目から144番目のアミノ酸配列が重鎖可変領域、145番目から149番目のアミノ酸配列がリンカー配列、150番目から256番目のアミノ酸配列が軽鎖可変領域に相当する。

[0138] 6-2. diabody発現株の樹立

これをDG44細胞に導入し、C3B3 diabody産生細胞株を樹立した。diabody発現ベクター各10 μ gをPvuIで切断し、PBS(-)に懸濁したDG44細胞 (1×10^7 cells/mL, 800 μ L) にエレクトロポレーション法(BIO-RAD社 GenePulser、1.5 kV、25 μ F)により導入した。生育培地(CHO-S-SFMII / PS)で適当な細胞数に希釈した後、96 well plateに撒き、翌日G418を500 μ g/mLになるように添加した。約2週間後にsingle cloneからなるwellを顕微鏡下で選別し、培養上清10 μ Lずつを用いてSDS-PAGEを行った。PVDF膜にブロッティング後、抗Flag M2抗体(SIGMA #F3165)、HRP-抗マウス抗体(Amersham Biosciences # NA9310)でウェスタンブロットを行い、diabodyを産生する細胞株のスクリーニングを行った。最も産生量の高い株を拡大培養した。

[0139] 6-3. diabodyの精製

C3B3 diabody発現DG44細胞株の培養上清100 mLを0.22 μ mフィルター(MILLIPORE # SLGV033RS)に通した後、ANTI-FLAG M2 Agarose Affinity Gel (SIGMA #A-

2220) 1 mL を充填したK9カラム(Amersham Biosciences #19-0870-01)に、P1ポンプを用いて流速1 mL/minで吸着させた。6 mLの50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 0.01% Tween20でカラムを洗浄した後、7 mLの0.1 M Glycine-HCl (pH3.5), 0.01% Tween20で溶出した。洗浄と溶出はAKTAexplorer 10Sを用いて流速1 mL/minで行った。溶出分画は、あらかじめ50 μ Lの1 M Tris-HCl (pH 8.0)を入れた5 mLチューブに、280nmの吸光度をモニターしながら0.5 mLずつ回収した。回収したフラクションはまとめてCentricon YM-10 (amicon #4205)を用いて300 μ Lまで濃縮した後、直ちにゲルろ過クロマトグラフィーを行った。

[0140] ゲルろ過クロマトグラフィーは、Superdex 200 HRカラム (Amersham #17-1088-01)を用いて、AKTAexplorer 10Sを使用して流速0.4 mL/minで行った。0.01% Tween 20, PBS(-)で平衡化した後、手動で上記M2精製サンプルをインジェクトした。フラクションは280nmの吸光度をモニターしながら5 mLチューブに0.5 mLずつ分取した。各ピーク毎にまとめて回収し、0.22 μ mフィルター(MILLIPORE #SLGV033RSまたはSLGV004SL)を通した後、4°Cで保存した。

[0141] 6-4. diabodyの細胞死誘導活性の解析

C3B3 minibodyはゲルろ過クロマトグラフィーの結果、図6のチャートに示すとおり、分子量(立体構造)の違いにより大きく3つのフラクションに分離された(ピーク(1)、ピーク(2)、ピーク(3))。これら各フラクションに関して、細胞死誘導活性を測定した。2D7 diabodyの細胞死誘導活性と比較した。

その結果、分子量の大きいフラクション(ピーク(1)、(2):C3B3 multimer)では、弱い細胞死誘導活性しか認められなかったが、ダイマーフラクション(ピーク(3):C3B3 diabody)で、2D7 diabodyをしのぐ強い細胞死誘導活性が認められた(図7)。

[0142] 6-5. 精製C3B3 diabodyと2D7 diabodyとの増殖抑制効果の比較

精製したC3B3 diabody (図6、ピーク(3))と現行の2D7 diabodyの増殖抑制能を比較した。ARH77細胞を96ウェルプレートに $1 \sim 2 \times 10^4$ cells/wellの細胞濃度で播種し、そこに得られた各抗体を適当な濃度になるように添加し、3日培養後細胞数の測定を行った。生細胞数の測定は、WST-8(生細胞数測定試薬SF;ナカライテスク)を用いて行った。すなわち本試薬を10 μ L/wellで細胞に添加し37°Cで1.5時間培養後、分

光光度計で450nmの吸光度を測定しその数値を相対的な生細胞数とした(図8)。

その結果、2D7 diabodyに比べて、C3B3 diabodyはより低い濃度で、強い増殖抑制能を示した。このことから、C3B3 diabodyは2D7 diabodyに比べて、強い抗腫瘍効果を持つ低分子抗体であることが証明された。

[0143] 〔実施例7〕 C3B3 diabodyの大量調製

7-1. 培養上清の調製

C3B3 diabody-Flag発現DG44細胞 1×10^7 cellsをCHO-S-SFMII (Invitrogen, c/n: 12052-098)/PS (Invitrogen, c/n: 15140-122)培地2 Lに懸濁しcellSTACK (Corning, c/n: 3271)にまきこんだ。5%CO₂ インキュベーター内で37℃にて培養し、生存率が60%未満になったところで培養上清を回収した(約7日間)。回収した培養上清は3000rpm、4℃、20分間遠心分離して、上清を0.22 μ mフィルター (Corning, c/n: 430513)に通して4℃で保存した。

[0144] 7-2. クロマトグラフィーによる精製(1)

7-2-1. 陰イオンカラムによる粗精製

Q Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, c/n: 17-0510-01)をXK50カラムに充填した(ベッド体積100 mL)。これを500 mLのmilliQ水、1 M NaCl, 0.01% Tween20を含むの20 mM Tris-HCl (pH7.5)(QB) 500 mLで順に洗った後、0.01% Tween20を含む20 mM Tris-HCl (pH7.5) (QA)500 mLで平衡化した。培養上清2 LにmilliQ水2 Lを加えて2倍希釈し、1 M Trisを約20 mL加えてpH7.8に調製したものを平衡化したカラムに吸着させた。吸着はP1ポンプを使用し、流速は最大10 mL/minとし、4℃で約15時間かけて行った。次に、AKTAprimeを使用して流速10 mL/minで洗浄と溶出を行った。16% QB 300 mLでカラムを洗浄した後、400 mLの25% QB、100 mLの30% QBで溶出を行った。フラクションは12 mLずつ15 mLチューブに分取した。280nmの吸光度をモニターしながら、25% QBに切り替えた後の最初のピークから30% QB 100 mLを流した時点までのフラクションを回収した。

回収したフラクションはまとめて0.22 μ mフィルター (Corning, c/n: 430626)に通し、0.6等量のQAを加えて塩濃度を約150 mMにした後、4℃で保存した。

カラムはQB 400 mL、0.1M NaOH 200 mL QB 200 mLで順に洗浄した後、500mL

のQAで平衡化して再生した。

[0145] 7-2-2. ANTI-FLAG M2 Affinityカラム(M2カラム)による精製

ANTI-FLAG M2 Affinity Gel Freezer-Safe (SIGMA, c/n: A2220)をXK26カラムに充填した(ベッド体積10 mL)。これを150 mM NaCl, 0.01% Tween20を含む50 mM Tris-HCl (pH7.4) (MA) 50 mL、0.01% Tween20を含む0.1 M Glycine-HCl (pH3.5)(MB) 30 mLで洗浄した後、MA 50 mLで平衡化した。

続いて陰イオンカラムで粗精製したサンプル540 mL(培養上清にして約2 L分)を直列につないだM2カラム2本に吸着させた。吸着は、P1ポンプを使用し、流速は最大1 mL/minとして、4°Cで約15時間かけて行った。その後、AKTAexplorer 10Sを使用して流速4 mL/minで洗浄と溶出を行った。50 mLのMAでカラムを洗浄した後、30 mLの100% MBで溶出を行った。溶出は、あらかじめ200 μ Lの1 M Tris-HCl (pH.8.0)を入れた5 mLチューブに280nmの吸光度をモニターしながら2 mLずつ回収した。回収したフラクションはまとめてCentriprep YM-10 (amicon, c/n: 4304)を用いて5 mLまで濃縮した後、直ちにゲルろ過を行い、バッファー置換を行った。目視で不溶物が認められた場合は0.22 μ mフィルター(MILLIPORE, c/n: SLGV013SL)を通してからゲルろ過を行った。

カラムはサンプル溶出後、MA 50 mLで平衡化して4°Cで保存した。1週間以上使用しない場合は150 mM NaCl, 0.02% NaN_3 を含む50 mM Tris-HCl (pH7.4)を30 mL以上流してから4°Cで保存した。

[0146] 7-2-3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (Amersham, c/n: 17-1071-01)を用いたゲルろ過でdiabodyを分離するとともにバッファー置換を行った。操作はAKTAexplorer 10Sを使用して流速2 mL/minで行った。0.01% Tween 20を含むPBS(-)で平衡化した後、手動で上記M2精製サンプルをインジェクトした。280nmの吸光度をモニターしながら、retention volume約200 mLのところに溶出するピークを、5 mLチューブに2.5 mLずつ回収した。回収したフラクションはまとめて0.22 μ mフィルター(MILLIPORE, c/n: SLGV033RS)に通して4°Cで保存した。

精製したdiabodyはロット毎に活性を調べた後、まとめてCentriprep YM-10 (amicon

n, c/n: 4304)で約1 mg/mLとなるように濃縮して、0.22 μ mフィルター(MILLIPORE, c/n: SLGV033RS)に通し保存した。

[0147] 7-3. クロマトグラフィーによる精製(2)

上記(7-1)で得られた培養上清から、イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの3つの工程によりC3B3 diabodyの精製を行った。

培養上清は、超純水で3倍に希釈した後、1 M トリスでpHを8.0に調整した。この後、0.02% Tween20を含む20 mM Tri-HCl (pH 8.0)で平衡化したQ Sepharose Fast Flow column (GEヘルスケア)にかけ、同緩衝液でカラムを洗浄後、同緩衝液中0 Mから0.5 MまでのNaClの直線濃度勾配で、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS-PAGEで分析しC3B3 minibody (C3B3 multimerとC3B3 diabody)を含む画分をすべて集めた。

[0148] 第一工程で得られたC3B3画分は、0.02% Tween20を含む10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0)で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(BIO-RAD、タイプI、20 μ m)に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、リン酸緩衝液濃度を250 mMまで直線的に上げ、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。溶出したピークは、SDS-PAGEとSuperdex 200 PC 3.2/30 column(GEヘルスケア)を使用したゲルろ過で分析した。目的のC3B3 diabodyの分子量を示したピークのみを集めた。

[0149] 第二工程で得られたC3B3 diabodyのピーク画分をamicon ultra 10 kDa cut (ミリポア)で濃縮し、0.01% Tween20を含むPBS(-)で平衡化しHiLoad 26/60 Superdex 200 pg column(GEヘルスケア)に添加した。得られた画分をSDS-PAGEで分析し目的のC3B3 diabodyが含まれるメインピークを精製画分とした。

精製したC3B3 diabodyは、Superdex 200 PC 3.2/30 columnを使用し分析ゲルろ過を行ったところシングルピークで、見かけ上の分子量約52 kDaを示した。

C3B3 diabodyはSDS-PAGE分析の結果、還元と非還元のいずれの条件ともモノマーの分子量位置(約27 kDa)に単一のバンドを示した。以上のことから、C3B3 diabodyは一本鎖Fvの2分子がノンコバレントに結合したダイマーであることが分かった。

[0150] [実施例8] C3B3 diabodyの薬効評価

8-1. C3B3 diabodyのin vitro細胞増殖に対する抑制効果

C3B3 diabodyの抗腫瘍効果を詳細に解析するため、まず、各種ヒト血液腫瘍細胞株に対する増殖抑制効果を以下のとおり調べた。

細胞はヒトEBV-transformed B細胞株ARH-77、IM-9、MC/CAR、およびヒトBurkitt's lymphoma細胞株HS-Sultanを用いた。ARH-77、IM-9、HS-Sultanの培養には10% FCSを含むRPMI1640培地を用いた。MC/CARの培養には20% FCSを含むIscove's modified Dulbecco's medium培地を用いた。ARH-77、IM-9は96ウェルプレートに 3×10^3 cells/well、MC/CARは 5×10^3 cells/well、HS-Sultanは 1×10^4 cells/wellの濃度で播種し、C3B3 diabodyまたは2D7 diabodyの存在下5%CO₂ インキュベーター中で37℃にて3日間培養した。続いて各ウェルにWST-8 (Cat. No. 07553-15、ナカライテスク株式会社)を添加し、さらに4時間培養後、マイクロプレートリーダーにて450 nm (参照波長655 nm)の吸光度を測定した。抗体を加えないウェルの吸光度を100%、細胞を加えないウェルの吸光度を0%として細胞増殖を測定した。試験はtriplicateにて行い、平均値および標準偏差を算出した(図9)。

実験に用いた全ての細胞株でC3B3 diabodyおよび2D7 diabodyはいずれも濃度依存的に細胞増殖を抑制した。しかしながら、両者を比較すると、C3B3 diabodyは2D7 diabodyよりも低濃度で、かつ最大活性で大きく上回る増殖抑制効果を示した。

[0151] 8-2. C3B3 diabodyの in vivo抗腫瘍効果

8-2-1. マウス血清ヒトIgG定量法

マウスの血清中に含まれるヒトIgGの定量には以下のELISAで行った。0.1 mol/L 重炭酸緩衝液(pH9.6)で1 μ g/mLに希釈したヤギ抗ヒトIgG (BIOSOURCE社製) 100 μ Lを96ウェルプレート(Nunc社製)に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固相化した。ブロッキングの後、段階希釈したマウス血清あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL社製) 100 μ Lを添加し、室温にて2時間インキュベーションした。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIOSOURCE社製) 100 μ Lを加え、室温にて2時間インキュベーションした。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER (BIO-RAD社)を用いて405 nmでの吸光度を測定した。

- [0152] 8-2-2. C3B3 diabodyのヒトEBV transformed B cell(IM-9)移植マウスに対する抗腫瘍効果

8-2-2-1. IM-9移植マウスの作製

IM-9移植マウスは以下のように作製した。10% FCS (Hyclone社製)を含むRPMI1640培地(SIGMA-ALDRICH社製)でin vitro継代したIM-9細胞を上記培地で 5×10^6 cells / mLになるように調整した。あらかじめ前日に抗アシアロGM1(和光純薬社製)100 μ Lを腹腔内投与したScidマウス(メス、6週令、日本クレア)に上記IM-9細胞調整液200 μ Lを尾静脈より注入した。

- [0153] 8-2-2-2. 抗体投与

上記IM-9移植マウスにIM-9移植後1、2、3日目に1日に2回、計6回、抗体(2D7 diabodyまたはC3B3 diabody)を10mg/kgで尾静脈投与した。コントロール群にはtween 20含有PBSを10mL/kgで尾静脈投与した。

- [0154] 8-2-2-3. C3B3 diabodyのIM-9移植マウスに対する抗腫瘍効果の評価

C3B3 diabodyの抗腫瘍効果については、マウスの生存期間および血清中のヒトIgG量で評価した。図10に示す通り、C3B3 diabodyを投与したマウスではコントロール群のマウスと比較して明らかな生存期間の延長が認められた。2D7 diabodyと比較しても生存期間の延長が認められた。また、IM-9移植後14日目にマウスより血清を採取し、上記8-2-1のELISAを用いて測定した(図11)。その結果、血清中ヒトIgG量は図11に示す通りC3B3 diabodyを投与したマウスではコントロール群のマウスと比較して血清中ヒトIgGの明らかな低下が認められた。2D7 diabodyと比較しても血清中ヒトIgGの低下傾向が認められた。従って、C3B3 diabodyがヒトEBV transformed B cell移植マウスに対して2D7 diabodyよりも強い抗腫瘍効果を有することが示された。

- [0155] [実施例9] ヒトPBMCに対するC3B3 diabodyの細胞死誘導作用検討

ヒト末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell、PBMC)に対するC3B3 diabodyおよび2D7 diabodyの細胞死誘導効果を検討した。健康成人ボランティアの末梢血より比重遠心法にてPBMCを単離した。このPBMCを96ウェルプレートに 5×10^4 cells / well(コンカナバリンAでの刺激時)あるいは 1.5×10^5 cells / well(SACでの刺激時)で播種した。コンカナバリンA(以下ConA、和光純薬工業)は終濃度10 μ g/mLで、SA

C (Pansorbin Cells、Carbiochem) は終濃度0.01%でそれぞれ添加した。さらにC3B3 diabodyあるいは2D7 diabodyをそれぞれ終濃度10 μ g/mLになるように添加した。これを5%CO₂ インキュベーター中で37℃にて3日間培養した。培養3日目にCell Counting Kit-8 (Dojindo社製) を各ウェルに10 μ Lずつ添加し、5%CO₂ インキュベーター中で37℃にて7時間反応させた後、MICROPLATE READER (BIO-RAD社) を用いて450 nm (参照波長630 nm) での吸光度を測定した。

その結果、図12に示すとおり、ConAで刺激した場合およびSAC刺激した場合ともに、C3B3 diabodyは2D7 diabodyと比較して強い細胞死誘導活性を示した。

[0156] [実施例10] C3B3 diabodyのin vitro細胞増殖に対する抑制効果

C3B3 diabodyのヒトT細胞系腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を以下のとおり調べた。

細胞はJurkat (E6-1)株(ATCCより購入)を用いた。Jurkat (E6-1)細胞の培養には10% FCSを含むRPMI1640培地を用いた。Jurkat細胞は96ウェルプレートに 2×10^4 cells/wellの濃度で播種し、C3B3 diabodyまたは2D7 diabodyの存在下5%CO₂ インキュベーター中で37℃にて3日間培養した。続いて各ウェルにCell Counting Kit-8 (Code. No. CK04、Dojindo Laboratories, Japan) を添加し、さらに2時間培養後、マイクロプレートリーダーにて450 nm (参照波長630 nm) の吸光度を測定した。抗体を加えないウェルの吸光度を100%、細胞を加えないウェルの吸光度を0%として細胞増殖を測定した。試験はtriplicateにて行い、平均値および標準誤差(SE)を算出した(図13)。

Jurkat細胞でC3B3 diabodyおよび2D7 diabodyはいずれも濃度依存的に細胞増殖を抑制した。しかしながら、両者を比較すると、C3B3 diabodyは2D7 diabodyよりも低濃度において強い増殖抑制効果を示した。

[0157] これまでの研究においてHLA抗体がリンパ球全般に効果を示すことが明らかとなっており(WO2004/033499、WO2005/100560)、以上の結果より本発明において新たに見出された全長抗体および低分子抗体は、リンパ球全般に効果を示すことものと考えられる。

産業条の利用可能性

[0158] 本発明によって、抗マウスIgG抗体でクロスリンクすることにより細胞死誘導活性を有

する新たな抗HLA-A抗体、C3B3抗体が提供された。また、C3B3抗体を低分子化 (diabody化) した抗体は、抗マウスIgG抗体を添加しなくても強力な細胞死誘導活性を示し、その活性は、in vitro 腫瘍細胞アッセイ系において従来の低分子化抗体を大きく上回った。さらに該低分子化抗体は、in vivo 腫瘍移植モデルマウスにおいても、従来の低分子化抗体よりも高い抗腫瘍効果を示した。すなわちC3B3低分子化抗体は従来の低分子化抗体に比べ、血液腫瘍細胞に対して高い殺細胞活性を示すと同時に、より低濃度で細胞死誘導活性を示す、という点で優れている。したがって該低分子化抗体は、血液腫瘍、骨髄免疫性疾患、および、自己免疫疾患などに対する治療薬として、従来の低分子化抗体よりも優れた薬効を期待できる。

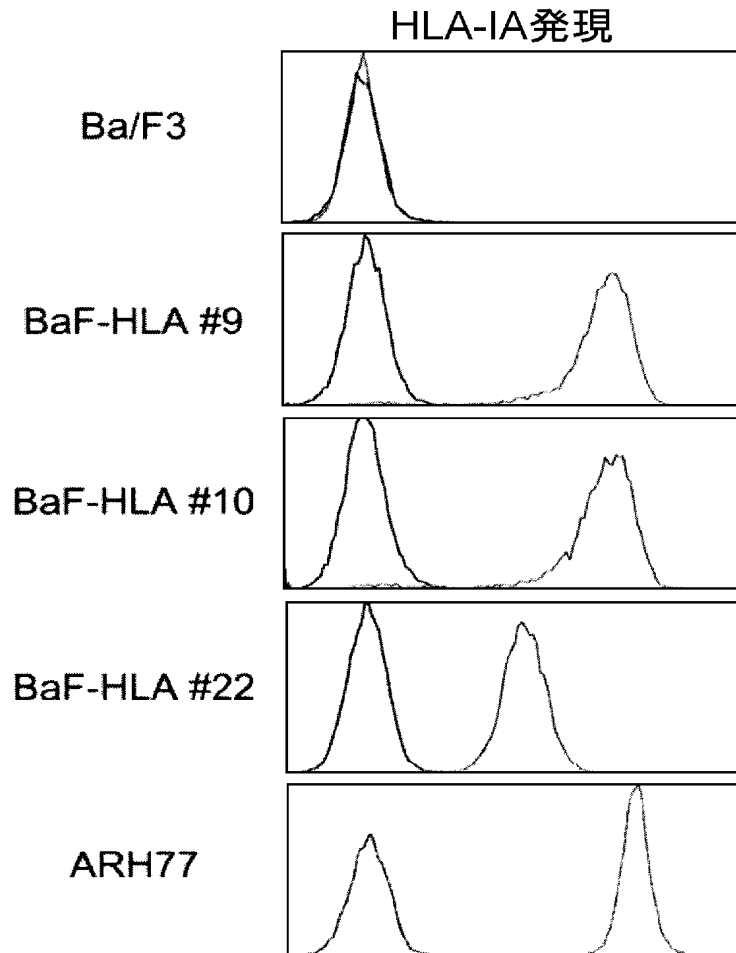
請求の範囲

- [1] 配列番号:7、8、9に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域を含む抗体。
- [2] 配列番号:10、11、12に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。
- [3] 配列番号:7、8、9に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域および配列番号:10、11、12に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。
- [4] 以下の(a)～(d)のいずれかに記載の重鎖可変領域を含む抗体。
(a)配列番号:2に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
(b)配列番号:2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する重鎖可変領域であって、(a)に記載の重鎖可変領域と機能的に同等な重鎖可変領域
(c)配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
(d)配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
- [5] 以下の(e)～(h)のいずれかに記載の軽鎖可変領域を含む抗体。
(e)配列番号:4に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域
(f)配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域であって、(e)に記載の軽鎖可変領域と機能的に同等な軽鎖可変領域
(g)配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域
(h)配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域
- [6] 以下の(a)～(d)のいずれかに記載の重鎖可変領域および(e)～(h)のいずれかに記載の軽鎖可変領域を含む抗体。

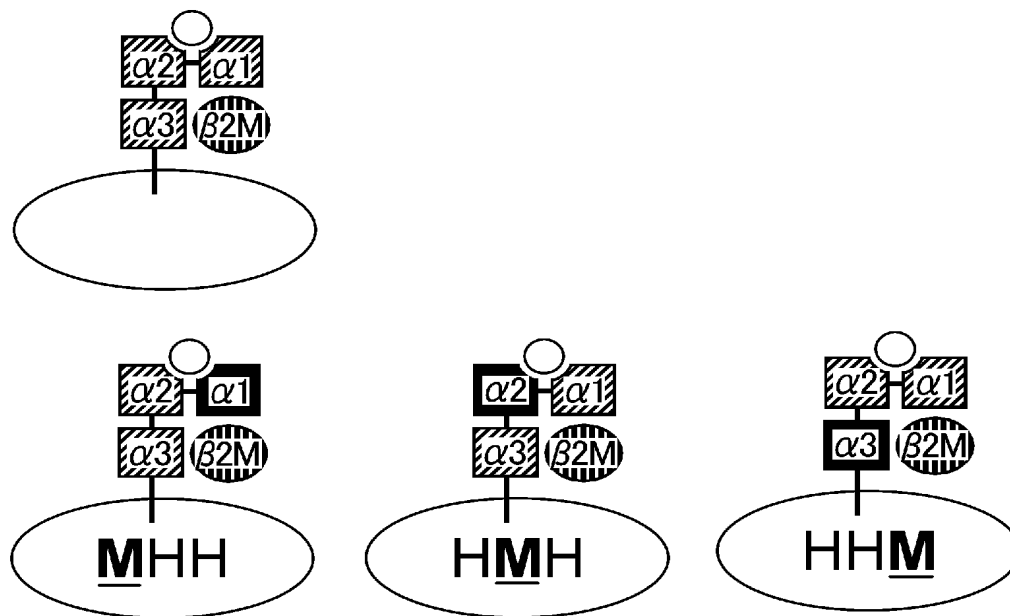
- (a) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
 - (b) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する重鎖可変領域であって、(a)に記載の重鎖可変領域と機能的に同等な重鎖可変領域
 - (c) 配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
 - (d) 配列番号:1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を有する重鎖可変領域
 - (e) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域
 - (f) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域であって、(e)に記載の軽鎖可変領域と機能的に同等な軽鎖可変領域
 - (g) 配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域
 - (h) 配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域
- [7] 以下の(a)～(d)のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する抗体。
- (a) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列
 - (b) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列
 - (c) 配列番号:5に記載の塩基配列からなるDNAがコードするアミノ酸配列
 - (d) 配列番号:5に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするアミノ酸配列
- [8] 請求項1～7のいずれかに記載の抗体が結合するヒト白血球抗原(HLA)タンパク質のエピトープと同じエピトープに結合する抗体
- [9] モノクローナル抗体である請求項1～8のいずれかに記載の抗体
- [10] ヒト白血球抗原(HLA)を認識する、請求項1～9のいずれかに記載の抗体。
- [11] HLAがHLA classIである、請求項10に記載の抗体。

- [12] HLA class IがHLA-Aである、請求項11に記載の抗体。
- [13] 低分子化抗体である、請求項1～12のいずれかに記載の抗体。
- [14] 低分子化抗体がdiabodyである請求項13に記載の抗体。
- [15] 以下の(a)または(b)に記載のポリヌクレオチド。
 - (a) 配列番号: 1、3、または5に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド
 - (b) (a)に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ請求項1～14のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチド。
- [16] 請求項15に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- [17] 請求項15に記載のポリヌクレオチドまたは請求項16に記載のベクターを保持する宿主細胞。
- [18] 以下の工程を含む請求項1～14のいずれかに記載の抗体を作製する方法。
 - (a) 請求項15に記載のポリヌクレオチドを作製する工程
 - (b) (a)に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを作製する工程
 - (c) (b)に記載のベクターを宿主細胞に導入する工程
 - (d) (c)に記載の宿主細胞を培養する工程
- [19] 請求項1～14のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤。
。
- [20] B細胞又はT細胞に対する細胞死誘導であることを特徴とする、請求項19に記載の細胞死誘導剤。
- [21] B細胞又はT細胞が、活性化B細胞又は活性化T細胞である、請求項20に記載の細胞死誘導剤。
- [22] 請求項1～14のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。
- [23] 請求項1～14のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤。
- [24] 腫瘍が血液腫瘍である請求項23に記載の抗腫瘍剤。
- [25] 請求項1～14のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する、自己免疫疾患治療剤。

[図1]



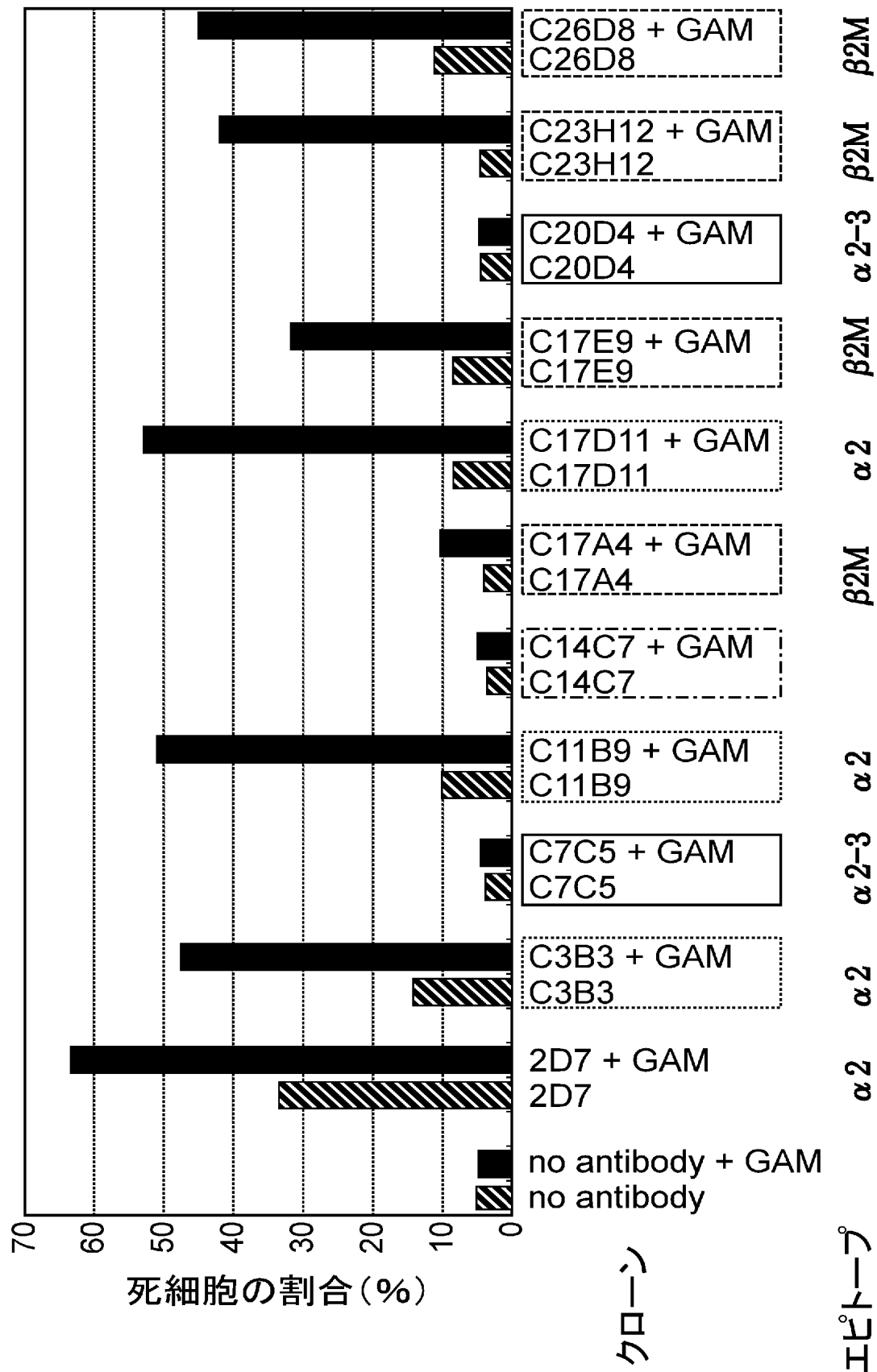
[図2]



[図3]

クローン	FACS反応性			エピトープ
	MHH	HMH	HHM	
2D7	+	-	+	α 2 ドメイン
C3B3	+	-	+	α 2 ドメイン
C11B9	+	-	+	α 2 ドメイン
C17D11	+	-	+	α 2 ドメイン
C7C5	+	-	-	α 1-2 ドメイン
C20D4	+	-	-	α 1-2 ドメイン
C17A4	+	+	+	β 2m
C17E9	+	+	+	β 2m
C23H12	+	+	+	β 2m
C26D8	+	+	+	β 2m
C14C7	-	-	-	該当せず

[図4]



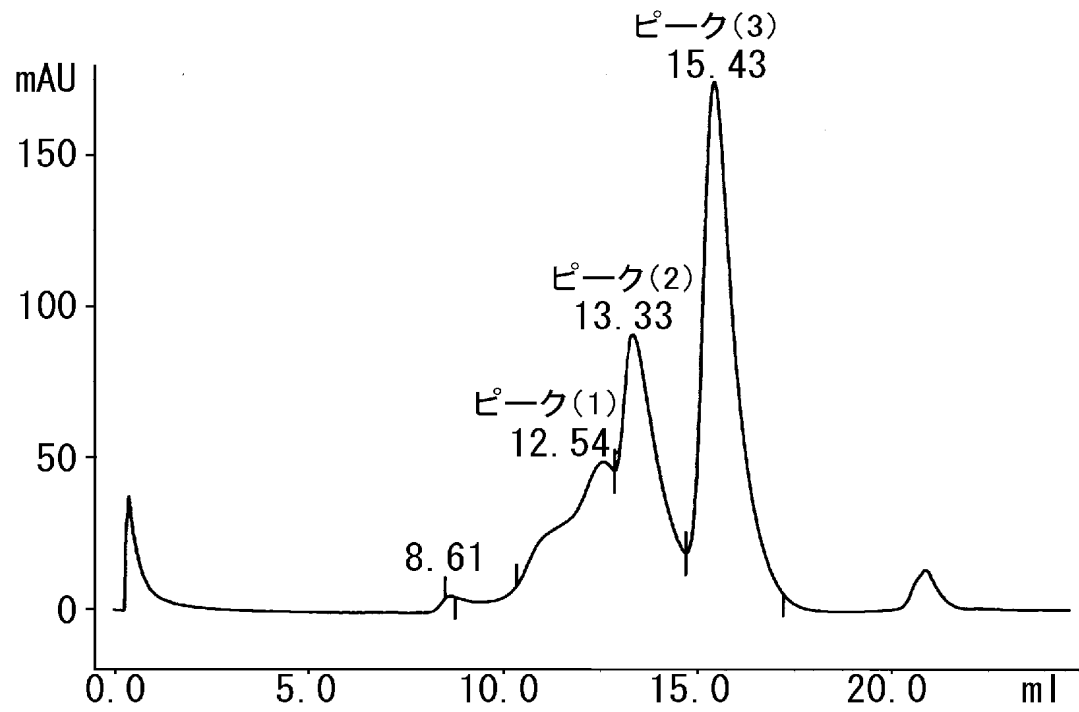
[図5-1]

VH可変領域			
VH断片			
	CDR1	FR2	CDR2
	-----1-----2-----3-----4-----5-----6-----		
123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	012A3456789012345
2D7 VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT	DYFIH	WVKQRPGQGLEWIG WIFPGDDT
(配列番号:40)			
C11B9	EVKLVESEGLVQPGSSMKLSCTASGFTS	DHYMA	WVRQVPEKGLEWVA DINYDGSRTYYLDSLKS
(配列番号:42)			
C3B3	EVKLVESEGLVQPGSSMKLSCTASGFTS	DHYMA	WVRQVPEKGLEWVA DINYDGSRTYYLDSLKS
(配列番号:2)			
C17D11	EVKLVESEGLVQPGSSMKLSCTASGFTS	DHYMA	WVRQVPEKGLEWVA DINYDGSRTYYLDSLKS
(配列番号:44)			
JH断片			
	CDR3		
	-----7-----8-----9-----10-----11-----		
67890123456789012abc345678901234	567890	ABCDEFGHIJK12	35678901234
2D7	KTTLTADKSSSTAYILLSSLTSED	SAMFCVR	SDDFDY-----WGQGTLLTVSS
C11B9	RFIIISRDNGKNILNLQMSSSLKSEDTATYYCAR	DRVRSYYSNLFAMDY---	WGQGISVTVSS
C3B3	RFIIISRDNGKNILYLQMSSSLKSEDTATYYCAR	DRVRSYYSNLFAMDY---	WGQGISVTVSS
C17D11	RFIIISRDNGKNILYLQMSSSLKSEDTATYYCAR	DRVRSYYSNLFAMDY---	WGQGISVTVSS

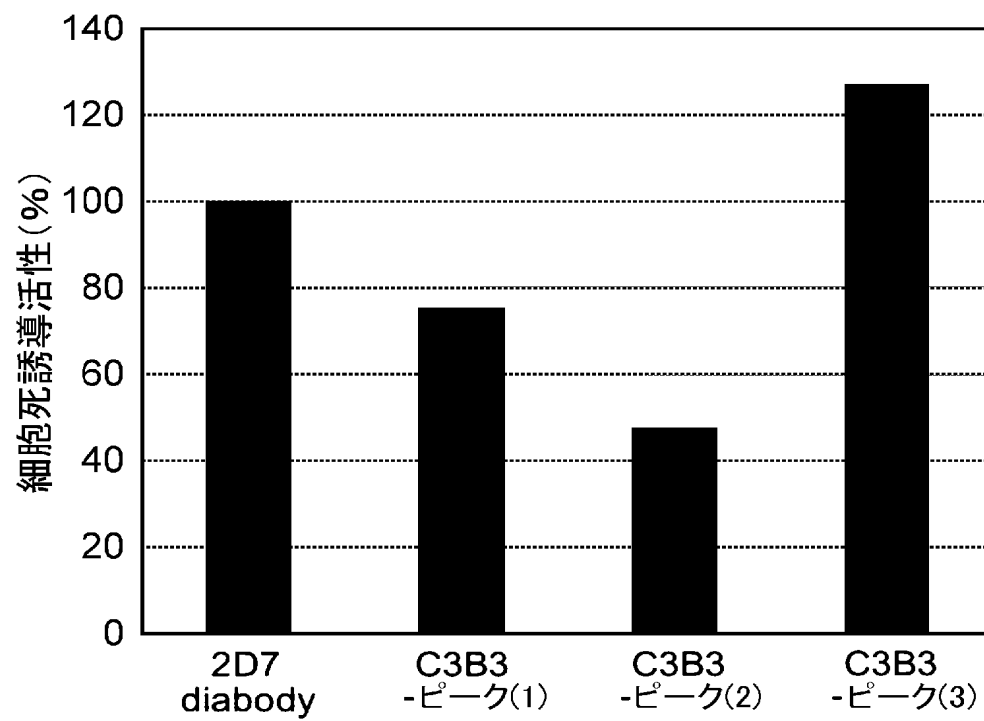
[図5-2]

VL可変領域				
VK断片				
	FR1	CDR1	FR2	CDR2
	-----1-----2-----3-----4-----5-----			
	12345678901234567890123	45678901ABCDE234	567890123456789	0123456
2D7 VL	QIVLTQSPALMSASPCEKVTITC	SASSSVSYMH	WFQQKPGTFRKLIWY	STSNLAS
(配列番号:41)				
C11B9	DIQMTQTTSSLASLGDRTVITSC	RASQDIANYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRRLHS
(配列番号:43)				
C3B3	DIQMTQTTSSLASLGDRTVITSC	RASQDIANYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRRLHS
(配列番号:4)				
C17D11	DIQMTQTTSSLASLGDRTVITSC	RASQDIANYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRRLHS
(配列番号:45)				
JK断片				
	FR3	CDR3	FR4	
	---6---7---8---9---10---			
	78901234567890123456789012345678	9012345ABCDEFF67	8901234567	
2D7 VL	GVPTRFSGSGGTSYSLTISRMEAEADAATYYC	QQRTSYPPPT	FGSGTKLEIK	
C11B9	GVPSRFSGSGGTSDYSLTISNLEPEDIAATYYC	QQYSKLPYT	FGSGTKLEIK	
C3B3	GVPSRFSGSGGTSDYSLTISNLEPEDIAATYYC	QQYSKLPYT	FGSGTKLEIK	
C17D11	GVPSRFSGSGGTSDYSLTISNLEPEDIAATYYC	QQYSKLPYT	FGSGTKLEIK	

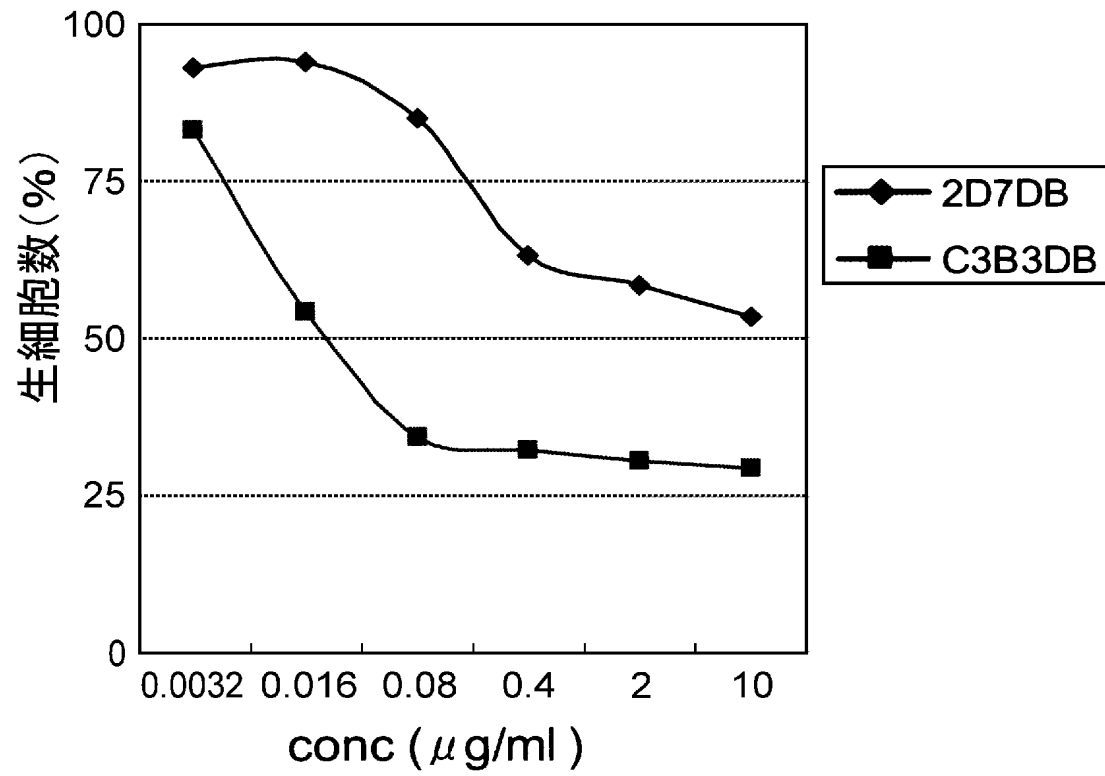
[図6]



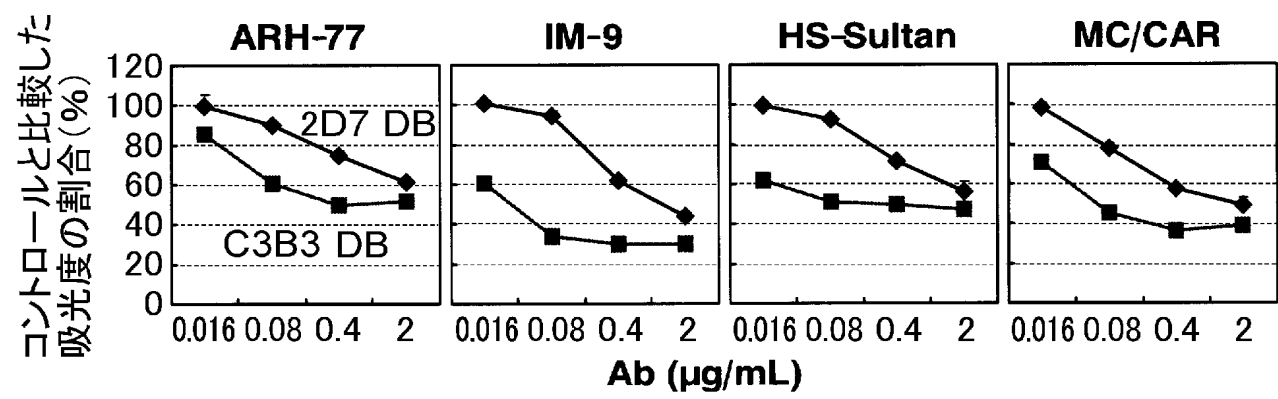
[図7]



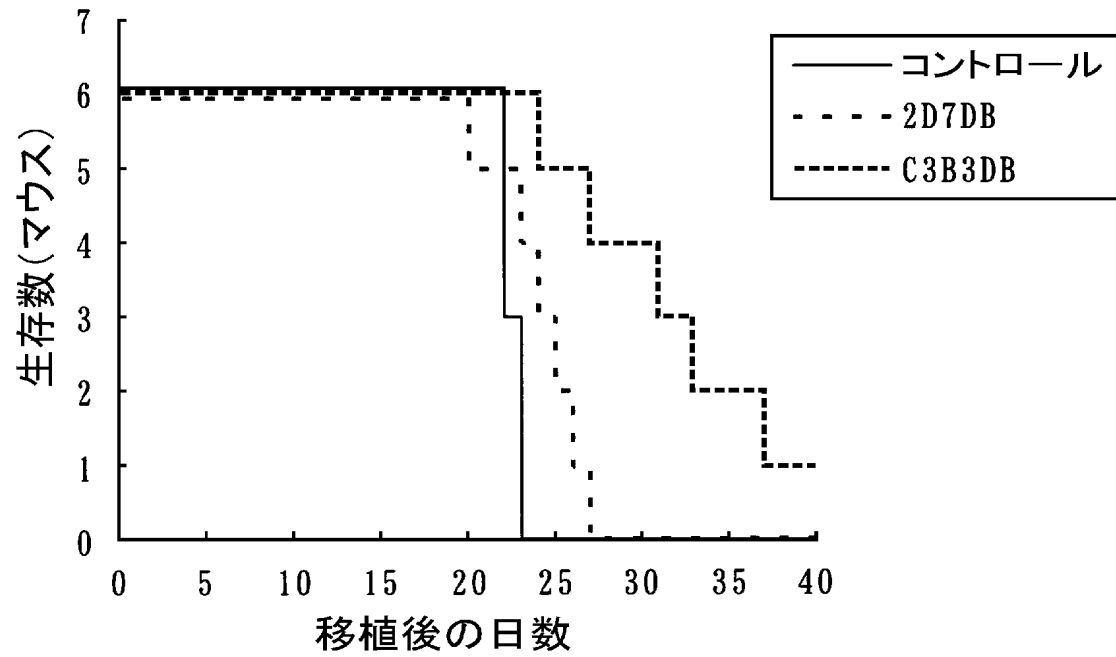
[図8]



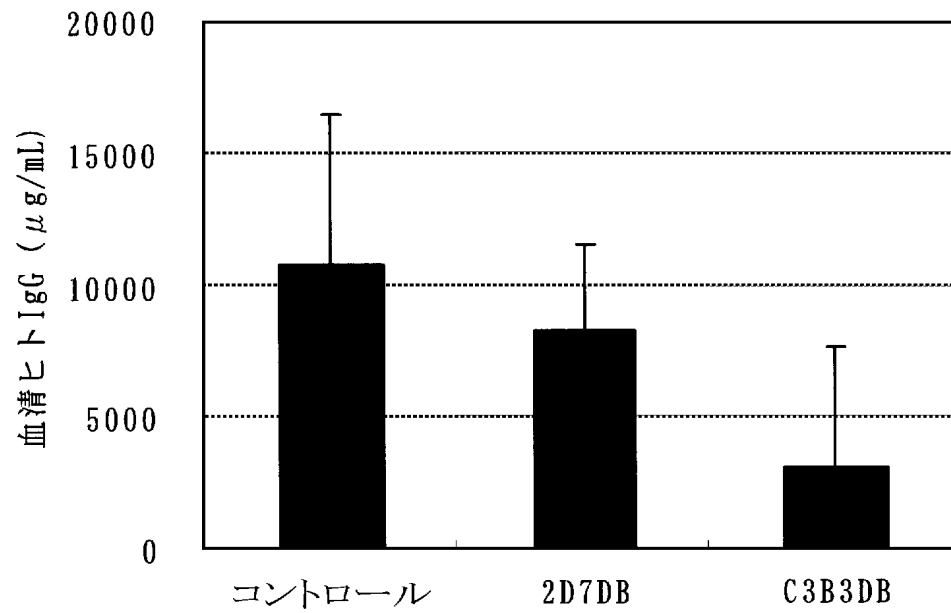
[図9]



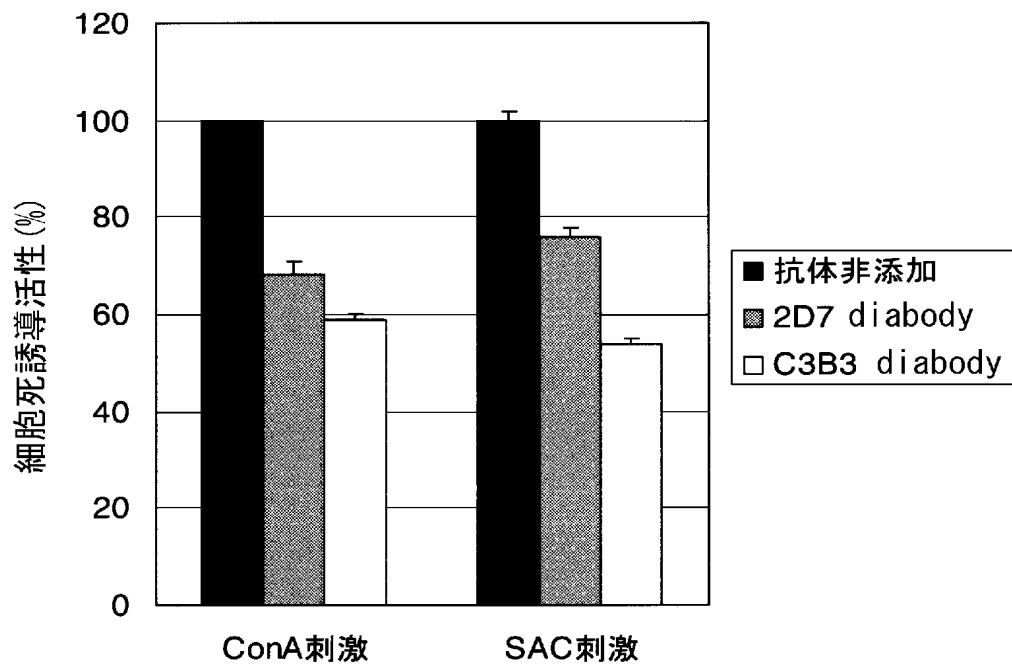
[図10]



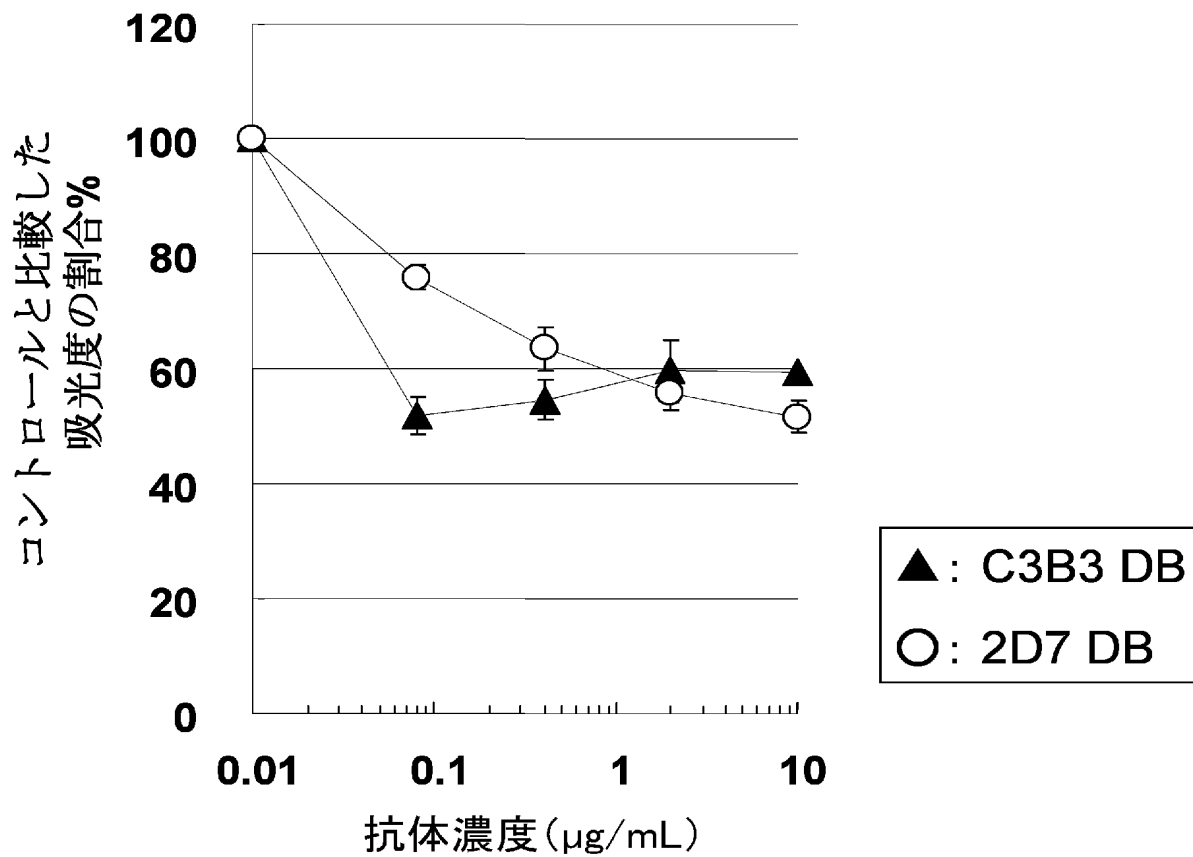
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/063946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00, A61K39/395, A61P7/00, A61P35/00, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/REGISTRY(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/033499 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 April, 2004 (22.04.04), Full text & EP 1561759 A1	1-7,9-25
A	KIMURA N. et al., 2D7 diabody bound to the alpha2 domain of HLA class I efficiently induces caspase-independent cell death against malignant and activated lymphoid cells., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, vol. 325, no. 4, p.1201-1209, abstract	1-7,9-25
A	GENESTIER L. et al., Fas-independent apoptosis of activated T cells induced by antibodies to the HLA class I alpha1 domain., Blood, 1997, vol. 90, no. 9, p. 3629-3639, abstract	1-7,9-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 August, 2007 (01.08.07)

Date of mailing of the international search report
14 August, 2007 (14.08.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/063946

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/063946

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 8
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
In claim 8, the antibody is specified by a function "capable of binding to the same epitope as that of a human leukocyte antigen (HLA) protein to which an antibody as recited in any one of claims 1-7 binds". However, the
(continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/063946

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

epitope recognized by the antibody of the present application is not specified in the present description. Therefore, it cannot be understood what types of antibodies this claim includes within its scope, and therefore this claim is unclear.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/00, A61K39/395, A61P7/00, A61P35/00, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/REGISTRY (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	WO 2004/033499 A1 (中外製薬株式会社) 2004.04.22, 全文 & EP 1561759 A1	1-7, 9-25	
A	KIMURA N., et al., 2D7 diabody bound to the alpha2 domain of HLA class I efficiently induces caspase-independent cell death against malignant and activated lymphoid cells., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, vo. 325, no. 4, p.1201-1209, abstract	1-7, 9-25	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 01.08.2007		国際調査報告の発送日 14.08.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 中野 あい	4 B 3 7 5 8
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GENESTIER L., et al., Fas-independent apoptosis of activated T cells induced by antibodies to the HLA class I alpha1 domain., Blood, 1997, vol. 90, no. 9, p. 3629-3639, abstract	1-7, 9-25

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 8 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲 8 は「請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の抗体が結合するヒト白血球抗原（HLA）タンパク質のエピトープと同じエピトープに結合する」という機能で抗体を特定しているが、本願明細書中において本願発明の抗体が認識するエピトープは特定されていないことから、前記請求の範囲はどのような抗体を包含しているかが不明であって、著しく不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。